
ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES SUR L'INFLUENCE DE L'ORGANISME SUR LES TOXINES

PAR EL. METCHNIKOFF

DEUXIÈME MÉMOIRE

INFLUENCE DU SYSTÈME NERVEUX SUR LA TOXINE TÉTANIQUE

Les recherches résumées dans mon premier mémoire sur les toxines (ces *Annales*, novembre 1897, p. 801) m'ont amené à étudier d'une façon plus détaillée les phénomènes qui se passent dans l'organisme des sauropsidés en général, et des poules en particulier, après injection de la toxine tétanique.

Dans le courant de ces expériences, faites pendant les deux dernières années, j'ai eu souvent occasion d'étudier l'action tétanigène sur des souris auxquelles j'avais injecté en même temps ou peu de temps auparavant des fragments du cerveau et de la moelle épinière de tortues et de poules; comme je l'ai dit dans mon premier mémoire, je n'ai observé aucune action antitoxique de ces organes.

Comme cette constatation semble être en désaccord avec les faits, si intéressants, découverts tout récemment par MM. *Wassermann* et *Takaki*¹, et comme d'un autre côté ces faits promettaient de jeter une vive lumière sur la question de la production de l'antitoxine, je me suis mis à étudier l'influence du système nerveux central sur la toxine du tétanos.

1. *Berliner klinische Wochenschr.*, 1898, n° 1.

Dans le but d'élucider l'apparente contradiction entre les résultats de MM. *Wassermann* et *Takaki*, obtenus surtout avec le cerveau de cobaye, et les miens, obtenus avec les centres nerveux des tortues et des poules, j'ai d'abord étudié comparative-ment l'influence du système nerveux central de ces diverses espèces animales sur la toxine tétanique.

J'ai pu d'abord confirmer l'expérience fondamentale et si intéressante de MM. *Wassermann* et *Takaki* : le cerveau de cobaye, broyé avec de l'eau stérile ou avec de la solution physiologique de chlorure de sodium, et injecté en mélange avec des doses plusieurs fois mortelles de toxine tétanique, préserve contre le tétanos les animaux les plus sensibles, comme le cobaye et la souris. Des doses minimales de cerveau exercent déjà une action manifeste, et, par exemple, 8 milligrammes de cerveau de cobaye normal peuvent suffire pour préserver des souris contre la dose sûrement mortelle (pour des souris non traitées) de toxine tétanique.

Le cerveau de cobaye produit cette action antitoxique non seulement chez la souris, mais aussi chez le cobaye.

Même le cerveau, prélevé sur des animaux atteints de tétanos mortel, manifeste son action contre la toxine tétanique dans le cas où on l'injecte en mélange avec celle-ci à des animaux neufs. Ainsi 36 milligrammes de cerveau, retirés à un cobaye en plein tétanos généralisé, ont préservé une jeune souris blanche contre le tétanos mortel. Des constatations analogues ont été faites pour le cerveau des souris tétaniques.

Eh bien, tandis que le cerveau de ces rongeurs, doués d'une sensibilité extraordinaire pour le tétanos, agit d'une façon si remarquable, les centres nerveux des animaux réfractaires ou très peu sensibles au tétanos n'exercent aucune action antitétanique, ou bien cette action n'est que très peu appréciable.

La moelle épinière des tortues (*Cistudo lularia* et *Testudo pusilla*), injectée à des souris en mélange avec des doses faibles de toxine tétanique, non seulement n'empêche pas le tétanos mortel de se produire, mais même n'amène aucun retard dans la marche et l'issue de la maladie. Le cerveau de ces reptiles ralentit l'apparition du tétanos, sans empêcher son développement, ni la mort.

Les centres nerveux de la poule, animal incomparablement

moins sensible au tétanos que le cobaye ou la souris, exercent une action faible sur le tétanos des souris. Ici encore la moelle épinière est inefficace, tandis que le cerveau, s'il n'empêche pas le développement du tétanos, ralentit au moins la marche de la maladie et transforme un tétanos aigu et mortel en une maladie chronique et guérissable. Et encore, pour obtenir cet effet, il ne faut se servir que de doses faibles de toxine, amenant la mort des témoins en trois à cinq jours au moins. Ces faits expliquent pourquoi, dans mes expériences de ces dernières années, je n'ai pas pu saisir l'effet antitétanique des centres nerveux des saurosidés étudiés.

Des données que je viens de résumer on pourrait conclure que l'action antitétanique des centres nerveux n'a rien à faire avec l'immunité des espèces animales qui fournissent la matière cérébrale, mais serait plutôt en rapport avec la réceptivité pour le tétanos. Plus un animal est sensible à la toxine tétanique, plus ses centres nerveux seraient efficaces contre ce poison. Dans l'intention de vérifier cette hypothèse, je me suis adressé à des grenouilles, animaux très sensibles pour le tétanos. Il est vrai qu'à des températures basses, les grenouilles ne contractent cette maladie qu'avec des doses considérables de toxine, mais à 37° (ou à peu près) il suffit de doses très petites pour amener chez elles le tétanos mortel. Ainsi toutes mes tentatives pour vacciner des grenouilles contre la toxine tétanique ont échoué à cause de la grande sensibilité de ces batraciens vis-à-vis du tétanos.

Eh bien, le cerveau des grenouilles (*Rana fusca*) est d'une inefficacité absolue contre la toxine tétanique, injectée en même temps que lui à des souris.

Il résulte donc de mes expériences que l'action antitétanique des centres nerveux est un privilège des mammifères. La poule a des centres nerveux beaucoup moins efficaces; les tortues ne produisent qu'un effet très faible; les grenouilles ne manifestent aucune action antitétanique.

On arrive à cette conclusion que le fait découvert par MM. Wassermann et Takaki ne peut nullement être utilisé pour expliquer l'immunité naturelle contre le tétanos. Déjà les données antérieures ont démontré que cette immunité ne pouvait être attribuée à une action antitoxique du sang. Celles que nous venons de

résumer prouvent qu'elle ne peut non plus trouver son explication dans une action antitoxique des centres nerveux. La thèse, exposée dans mon premier mémoire, que *l'immunité naturelle ne dépend pas du pouvoir antitoxique*, se trouve donc corroborée.

Mais peut-être l'immunité acquise pourrait-elle être réduite à l'action antitétanique des centres nerveux des animaux vaccinés contre le tétanos? Des expériences inédites de MM. Roux et Vaillard sur les lapins immunisés, ainsi que mes propres recherches sur les poules, dont le sang était devenu antitoxique à la suite d'injections de toxine tétanique, ne plaident pas en faveur de cette hypothèse. Mais, comme le problème est en général très délicat et compliqué, il était nécessaire de chercher des faits nouveaux, capables de l'élucider autant que possible.

Comme les éléments qui produisent l'antitoxine peuvent en même temps renfermer des dépôts de toxine ou au moins de toxoïdes d'Ehrlich, ces substances pourraient masquer l'action antitétanique des centres nerveux des animaux injectés avec de fortes quantités de toxine tétanique. Voilà pourquoi il est devenu très important de faire des études comparatives du pouvoir antitoxique des humeurs et des centres nerveux d'animaux immunisés qui, depuis une période de temps suffisamment longue, n'avaient pas reçu d'injections toxiques. C'est ce que nous avons tâché de réaliser.

Parmi nos poules, traitées avec de la toxine tétanique, il s'en est trouvée une dont le sang était encore sensiblement antitoxique, bien que la poule n'eût plus reçu de toxine depuis près de huit mois (239 jours). Une partie des hémisphères du cerveau a été enlevée à l'animal vivant, dans le but d'étudier le pouvoir antitétanique de cet organe, comparé à la propriété antitoxique du sang. Cette expérience a démontré que le sang était plus antitétanique que le cerveau. Ainsi par exemple, 40 centigrammes de ce dernier n'ont pas empêché le tétanos, tandis que 6 centigrammes de sang étaient suffisants pour préserver une souris. L'injection de mélange d'une dose de toxine tétanique faiblement mortelle (en 5 et 6 jours), avec 0,05 gramme de cerveau n'a pas empêché une souris de mourir en même temps que le témoin. Et cependant cette quantité de cerveau d'une poule normale est déjà quelquefois capable d'exercer une certaine influence (quoique faible) sur la marche du tétanos.

L'opération d'ablation d'une partie du cerveau, comme c'est la règle, a été bien supportée par la poule. Le lendemain il s'est produit une leucocytose notable, et le sang, retiré deux jours après l'ablation d'une partie des hémisphères, s'est montré plus antitoxique qu'auparavant. Trois centigrammes de sang entier ont suffi pour empêcher le tétanos de se produire chez une souris. Son pouvoir antitétanique a donc doublé.

La poule opérée a été gardée pendant 17 jours, après quoi elle a été sacrifiée, dans l'intention d'étudier la propriété antitoxique de ses organes. Cette fois le sang a été trouvé moins antitétanique que le surlendemain de l'opération, et même moins actif qu'avant celle-ci. 3 centigrammes n'empêchaient plus le développement du tétanos, et même la dose double (0,06 gramme) n'était pas suffisante pour préserver les souris d'une façon complète; elles prirent un léger tétanos, duquel elles guérissent facilement.

Le cerveau s'est montré au contraire plus efficace qu'auparavant. Les doses employées étaient, il est vrai, incapables d'empêcher le tétanos; mais elles amenaient un certain ralentissement dans la marche de la maladie. Le pouvoir antitétanique du cerveau s'est montré égal à celui du sang entier. Par contre, la moelle épinière n'a pas manifesté d'action antitoxique à des doses correspondantes aux doses actives du sang et du cerveau.

De tous les autres organes internes (muscles, foie, rate, reins, moelle des os, ovaire), l'ovaire, composé d'ovules jeunes, ne renfermant que du vitellus blanc, s'est montré le plus efficace. Dix centigrammes de ce vitellus ont préservé d'une façon complète la souris contre la dose de tétanine, mortelle en trois ou quatre jours. Les ovules ont donc été plus antitétaniques que la moelle épinière.

Les faits que je viens de résumer ne permettent pas de voir dans les centres nerveux la source unique ni principale de l'antitoxine tétanique, chez la poule traitée par la toxine. Si tel était le cas, on ne comprend pas pourquoi le sang, liquide renfermant beaucoup plus d'eau que les systèmes nerveux, présenterait un pouvoir antitétanique égal ou même plus fort que le cerveau et la moelle épinière.

Comme, dans l'expérience que je viens citer, il s'est présenté cet inconvénient que la propriété antitoxique du sang n'avait

été que peu marquée, je me suis adressé à un cobaye vacciné, chez lequel le pouvoir antitétanique des humeurs était plus prononcé, et qui, sous d'autres rapports aussi, présentait de grands avantages pour l'expérimentation.

Il s'agit d'un cobaye vacciné contre le tétanos en 1895, et qui a reçu sa dernière injection de toxine il y a déjà presque deux ans (exactement depuis 23 mois et 12 jours avant l'opération). Malgré ce long laps de temps, son sang a encore été si nettement antitoxique, que deux dix millièmes de c. c. empêchaient le tétanos mortel (qui tuait les témoins en 3 ou 4 jours), et des doses un peu plus élevées préservaient complètement contre le tétanos.

Dans le but d'étudier l'action antitoxique des liquides de l'organisme (pour la comparer ensuite avec celle des organes), j'ai provoqué chez le cobaye en question une exsudation péritonéale, à l'aide d'une injection de 10 c. c. de solution physiologique de NaCl. Vingt-deux heures après j'ai retiré un exsudat opaque, renfermant 118,000 leucocytes par m. m. c. (dont 46 0/0 de gros mononucléaires). Son pouvoir antitétanique s'est montré au moins deux fois plus fort que celui du sang entier : 0,0002 c. c. empêchaient le tétanos de se développer, tandis qu'avec 0,0001 c. c. les souris ne prenaient qu'un tétanos des plus légers, duquel elles guérissaient au bout de quelques jours.

Trois jours après, il a été fait une nouvelle prise de l'exsudat péritonéal. Cette fois-ci il était purement hémorragique, ne renfermait que 43,800 leucocytes dans 1 m. m. c. et, au point de vue de la propriété antitétanique, il se comportait tout à fait comme le sang entier dont j'ai déjà parlé.

Le lendemain de la dernière prise de l'exsudat péritonéal, il a été retiré un peu de substance des hémisphères du cerveau, opération qui a été bien supportée par le cobaye. La masse cérébrale extraite a été broyée avec de la solution physiologique de NaCl, stérilisée et inoculée dans la cuisse de souris blanches, mélangée avec la toxine tétanique. Injecté à toute une série de souris, le cerveau s'est montré notablement moins antitétanique que le sang et l'exsudat péritonéal. Pour préserver une souris du tétanos, il fallait lui introduire une quantité de cerveau 25 fois plus forte (0,005 gramme) que celle d'exsudat péritonéal. La moitié de cette dose (0,0025 gr.) n'empêchait pas

encore le développement manifeste du tétanos avec une quantité de toxine qui tuait les témoins en 3-4 jours. Avec des doses de cerveau qui correspondaient à des quantités de sang sûrement et entièrement antitoxiques (0,0003-0,0006 gr.) les souris prenaient un fort tétanos chronique, tandis que les quantités de matière cérébrale, auxquelles correspondaient des doses efficaces de l'exsudat péritonéal (0,00015 gr.) ne faisaient que retarder la mort de deux jours.

Comme les cobayes résistent souvent moins bien à l'ablation cérébrale que les poules, le mien, quoique bien rétabli et en bon état, a été sacrifié deux jours après l'extraction d'une partie des hémisphères.

En fait d'humeurs, on a étudié le sang entier (renfermant 18,200 leucocytes dans 1 m. m. c.), l'exsudat péritonéal hémorragique (avec 25,400 leucocytes dans 1 m. m. c., dont 28 0/0 de gros mononucléaires) et le liquide du péricarde (avec 4,500 leucocytes, dont 47 0/0 de macrophages). Les deux premiers liquides se sont montrés de force antitétanique pareille, mais plus active que n'a été le sang avant l'ablation du cerveau. Il s'est produit après celle-ci un accroissement du pouvoir antitoxique, semblable à celui du sang de la poule. Avec 0,00012 c. c. de sang ou de l'exsudat péritonéal, le tétanos n'était pas complètement empêché, mais présentait une forme très légère et passagère. Même une dose deux fois moindre (0,00006 c. c.), incapable d'empêcher le tétanos grave, amenait cependant la guérison définitive. Le liquide péricardique a manifesté une efficacité sensiblement plus faible que les deux autres liquides, mais il empêchait le tétanos grave et mortel même à la dose de 0,00012 c. c.

En outre des centres nerveux (cerveau et moelle épinière), le pouvoir antitétanique a été étudié avec le foie, la rate, la moelle des os, le rein et les capsules surrénales.

Le cerveau et la moelle épinière ont manifesté une propriété antitoxique égale, et notablement plus faible que le sang et les autres liquides de l'organisme. Même 0,0019 grammes de cerveau et 0,0018 grammes de moelle n'ont pas empêché le développement d'un tétanos fort avec des doses de toxine qui ne tuaient les témoins qu'en 4 à 5 jours $1/2$.

Malgré l'injection de 0,00095 grammes de cerveau, la souris

est morte de tétanos avec un retard de deux jours, et la souris qui a reçu la moitié de cette dose de cerveau (0,00047 grammes), est morte du tétanos avant son témoin.

Les centres nerveux ont donc présenté un pouvoir antitétanique dix fois plus faible que le sang et l'exsudat péritonéal.

Comme le cobaye a été sacrifié par la saignée à blanc, les organes internes ne renfermaient pas beaucoup de sang. Et cependant tous ceux que j'ai examinés ont manifesté une action antitétanique plus forte que les centres nerveux, mais moindre que les liquides; c'est le rein qui s'est montré le plus antitoxique parmi les viscères, ce qui correspond aux données établies par M. Dzierzowski¹ pour des chevaux immunisés contre la toxine diphtérique.

Le foie a présenté une antitoxicité à peu près quatre fois plus forte que les centres nerveux. La rate et la moelle des os se sont montrés au contraire être les viscères les moins antitétaniques.

Le cobaye, dont je viens de résumer l'histoire, nous fournit des renseignements encore plus précis que ceux que nous avait donnés la poule. Nous sommes conduit à cette conclusion que *les centres nerveux, même dans des conditions particulièrement favorables, ne se présentent pas comme le foyer de production ou le lieu de dépôt d'antitoxine, qui de là passerait dans le sang et les autres humeurs de l'organisme.*

Pour M. Wassermann et un grand nombre des savants qui ont analysé son travail, il paraît naturel d'admettre que la propriété antitoxique de la matière des centres nerveux correspond à la même propriété existant dans ces organes à l'état normal. Et cependant il est impossible d'accepter cette manière de voir. Déjà au moment des publications de MM. Wassermann et Takaki, M. Roux est arrivé à cette conclusion, basée sur un travail sur le tétanos céphalique, exécuté par M. Morax dans son laboratoire, que *les choses doivent se passer d'une façon bien différente lorsque la toxine tétanique pénètre dans le cerveau normal, et lorsqu'elle est introduite dans l'organisme avec de la substance cérébrale broyée.* En effet, M. Morax a pu constater que la toxine tétanique, injectée dans le cerveau, produit invariablement le tétanos cérébral, même si l'on n'introduit que la dose minimale mortelle pour un lapin par injection sous-cutanée.

1. *Archiv f. exper. Pathologie* 1897. F. 38, p. 211.

Les faits rapportés dans ce mémoire corroborent cette manière de voir. Ainsi, les animaux en plein tétanos fournissent une substance cérébrale, dont une petite quantité suffit pour préserver du tétanos des animaux neufs. Le cerveau d'un cobaye, incapable de protéger contre la dose simplement mortelle de la toxine tétanique lorsqu'il se trouve dans ces conditions naturelles, suffit pour préserver au moins dix cobayes, qui le reçoivent broyé, en mélange avec la même dose de toxine tétanique. Les expériences de M. Marie, publiées dans ce même numéro des *Annales*, dans lesquelles une partie du cerveau, prélevée sur un lapin et injectée au même animal avec la dose mortelle de toxine tétanique, le préserve contre le tétanos, amènent à la même conclusion. Il se produit donc dans cette immunité artificielle, conférée par les centres nerveux, quelque chose d'analogue avec ce qui se passe pour la propriété bactéricide du sang des rats. Ces rongeurs prennent facilement le charbon, inoculé sous la peau; la maladie devient sûrement mortelle et n'est nullement empêchée par toute la masse du sang de l'animal. Mais lorsqu'on introduit avec la bactériémie un peu de sang retiré à un rat, celui-ci résiste au charbon.

Dans cet exemple d'immunité artificielle, conférée par du sang d'un animal sensible au charbon, il s'agit d'une propriété bactéricide très accusée, exercée par le sang de l'organisme, vis-à-vis de la bactériémie. En est-il de même pour l'immunité contre le tétanos, produite avec la substance cérébrale? Cette substance, impuissante pour empêcher le tétanos, lorsqu'elle se trouve dans ces conditions naturelles, serait-elle capable de détruire la toxine tétanique, lorsqu'elle est broyée et mélangée avec celle-ci? Cette supposition doit être rejetée en présence du fait que l'émulsion de matière cérébrale de cobaye est plus active pour la souris que pour le cobaye. En effet, si l'on injecte dans la cuisse de ces deux espèces de rongeurs les mêmes mélanges de substance cérébrale avec la toxine tétanique, on constate que le tétanos est plus facilement empêché chez la souris que chez le cobaye. *La toxine tétanique n'est donc pas détruite par la masse cérébrale broyée, et l'efficacité de celle-ci doit être attribuée à l'intervention de l'organisme même.*

Lorsqu'on examine les phénomènes qui se produisent dans l'organisme qui a reçu de la toxine tétanique seule ou bien

additionnée de substance cérébrale, on trouve une grande différence dans les deux cas. On peut la constater dans n'importe quelle région de l'organisme, mais c'est la chambre antérieure de l'œil des lapins qui se prête le mieux à ce genre d'observation. A la suite d'une injection de toxine tétanique seule, l'œil conserve son état normal ou à peu près, la réaction étant insignifiante. Lorsque au contraire on introduit dans la chambre antérieure la même toxine avec un peu de substance cérébrale broyée, on voit se produire une inflammation intense qui amène un hypopyon. Cette réaction est beaucoup plus forte que celle qu'on obtient après l'injection de la substance cérébrale seule.

Le mélange de toxine tétanique et de masse cérébrale provoque donc une réaction inflammatoire considérable dans l'œil, comme dans les tissus de la cuisse ou ailleurs encore, et cette réaction amène une quantité de leucocytes. Or, depuis longtemps on a remarqué que ces cellules, si aptes à saisir et détruire les microbes, sont aussi capables d'absorber des substances toxiques.

Dans mon rapport sur l'immunité, présenté au congrès de Budapest en 1894¹, j'ai insisté sur ce fait que les phagocytes réagissent non seulement contre les microbes, mais aussi contre les poisons.

Dans le mémoire sur le choléra, publié par MM. Roux, Salimbeni et nous-même², il a été question de ce rôle des leucocytes dans la péritonite cholérique expérimentale, et il a été exprimé cette idée que les leucocytes, saisissant les vibrions, digèrent en même temps les microbes et « la toxine qu'ils contiennent ». Ce rôle des phagocytes, dirigé contre les poisons, devient de plus en plus évident, et il est extrêmement probable qu'il s'exerce aussi dans le cas de l'immunité artificielle contre le tétanos conférée par la masse des centres nerveux. Nous espérons dans un mémoire prochain revenir sur cette question qui présente un intérêt général.

1. Ces *Annales*, 1894, pp. 719 et 721.

2. Ces *Annales*, 1896, p. 272.

RECHERCHES SUR LES « PROPRIÉTÉS ANTITÉTANIQUES » DES CENTRES NERVEUX DE L'ANIMAL SAIN

PAR LE D^r A. MARIE.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Dans un travail antérieur ¹, nous avons entrepris autrefois une série d'expériences sur le sort de la toxine tétanique injectée chez différents animaux; dans aucun cas, nous n'avions pu déceler trace du poison dans aucun des organes du corps, en particulier ni dans l'encéphale ni dans la moelle épinière.

La découverte récente de Wassermann ² sur « l'action antitétanique des centres nerveux » chez l'animal sain explique ces résultats négatifs. On sait en quoi consiste l'expérience de Wassermann. Si dans une émulsion d'éléments du cerveau ou de la moelle d'un animal sain, on incorpore la dose de toxine tétanique mortelle, on pourra injecter ce mélange à une souris, sans qu'elle prenne le tétanos, dont mourra la souris témoin qui a reçu la même dose de toxine seule.

Les mammifères, aptes à contracter le tétanos; quelques oiseaux, dont le pigeon, qui sont également sensibles à la toxine, présentent cette propriété intéressante de leurs centres nerveux.

Nous allons relater ici quelques expériences pour lesquelles nous avons opéré sur le lapin.

Ayant trituré et dilué le cerveau entier d'un lapin normal dans 20 c. c. d'eau physiologique stérile, on pratique les trois inoculations suivantes :

1^o A un lapin de 2 kilos on injecte sous la peau 1/4 de

1. A. MARIE, Recherches sur la toxine tétanique. (*Annales de l'Institut Pasteur*, juillet 1897.)

2. WASSERMANN et TAKAKI, Ueber eine neue Art von künstlicher Immunität. Ueber Tetanus-Antitoxische Eigenschaften des normalen Centralnervensystem (*Berliner klin. Woch.*, 3 janvier 1898.)

milligramme d'une toxine tétanique dont la dose minima mortelle pour cet animal est $1/10$ de milligramme;

2° On inocule un lapin de même poids avec un mélange de $1/4$ de milligramme de toxine et de 1 c. c. de l'émulsion du cerveau d'un lapin neuf;

3° Un troisième reçoit $1/4$ de milligramme de toxine additionné de 4 c. c. de l'émulsion.

Or, tandis que le témoin prend un tétanos rapide auquel il succombe le 4^e jour, le dernier lapin n'offre aucun signe de la maladie. Quant au n° 2, il présente des symptômes tétaniques légers auxquels il succombe seulement 20 jours après l'inoculation.

Ainsi donc, une petite quantité d'une macération de cerveau frais a suffi pour empêcher l'action d'une dose 2 fois $1/2$ plus forte que la dose minima mortelle de toxine tétanique.

La moelle épinière, d'après les recherches de Wassermann, possède « un pouvoir antitétanique de moitié moins fort que le cerveau ».

Si l'on cherche à se rendre compte des « propriétés antitétaniques » des différentes parties de l'encéphale d'un mouton, par exemple, on constate en effet que celles qui sont des prolongements de la moelle sont moins actives.

Un lapin, inoculé avec $1/10$ de milligramme de toxine tétanique dilué dans 1 c. c. d'une macération des pyramides bulbaires, présente des signes légers de tétanos; le témoin succombe au 6^e jour.

D'autre part, le « pouvoir antitétanique » de la substance grise varie suivant sa provenance : les cellules des ganglions centraux sont beaucoup moins actives que celles de l'écorce cérébrale.

Si on inocule à un lapin 1 c. c. d'une émulsion des corps opto-striés du mouton, additionné de la dose minima mortelle de toxine, l'animal présentera une légère contracture de la patte inoculée.

Les cellules de l'écorce cérébrale sont même tellement actives, qu'il en suffit de quantités minimales pour préserver l'animal du tétanos.

On peut réaliser l'expérience de façon à montrer que ses propres cellules cérébrales sont capables de prévenir l'apparition du tétanos chez l'animal lui-même.

On prend 3 lapins : le premier subit la résection de toute la zone post-rolandique de son hémisphère droit ; la partie sectionnée est laissée en place. Il reçoit ensuite 1/10 de milligramme de toxine tétanique sous la peau.

Un deuxième subit la même opération, avec cette différence qu'on enlève la portion cérébrale réséquée ; il reçoit également la dose minima mortelle de toxine. Enfin on injecte au 3^e lapin la même portion réséquée de son propre hémisphère droit, triturée, et additionnée de 1/10 de milligramme de toxine.

Les deux premiers lapins témoins prennent en même temps un tétanos auquel ils succombent ; le dernier, au contraire, n'offre aucun signe tétanique et survit.

Or, la quantité de matière cérébrale réséquée ne dépassait pas 25 à 30 centigrammes ; de plus, elle n'était pas composée exclusivement des cellules corticales, mais comprenait aussi les fibres blanches sous-jacentes. Enfin, comme nos dilutions ont toujours été faites dans la proportion d'une partie de substance nerveuse pour deux parties d'eau physiologique, on peut donc affirmer que les cellules de l'écorce cérébrale peuvent, à un haut degré, prévenir le développement du tétanos.

L'expérience devient encore plus frappante si on la compare à ce qui se passe quand on injecte sous la peau, ou même dans l'encéphale, la toxine tétanique. Dans ces cas, on sait que la même dose provoque le tétanos ; par conséquent, tandis que dans les conditions ordinaires d'inoculation, *le cerveau tout entier est incapable de protéger l'animal contre l'action tétanisante de la toxine libre, au contraire, une parcelle de ce même cerveau suffira pour le garantir du tétanos, pourvu que la toxine injectée ait été préalablement incorporée et fixée à quelques cellules cérébrales.*

Nous verrons en effet plus loin que cette fixation artificielle de la toxine sur les éléments nerveux est la condition *sine qua non* de la réussite de l'expérience de Wassermann.

Mais, auparavant, revenons à nos expériences antérieures ; d'après elles la moelle et l'encéphale d'animaux tétanisés peuvent être broyés et injectés à des souris sans que ces dernières présentent la moindre contraction tétanique. Il n'en faudrait pas conclure que la toxine n'est pas localisée dans les centres nerveux ; au contraire, elle s'y trouve si bien fixée, si solidement retenue, qu'il est impossible de l'y déceler, en employant le seul

procédé à notre disposition. Il faudrait la séparer des cellules qui la retiennent, et c'est actuellement au-dessus de nos moyens. Même en admettant que la toxine se trouve localisée en un point de la moelle épinière, nous ne faisons que réaliser l'expérience de Wassermann en broyant et en injectant la moelle tout entière, puisque du même coup nous inoculons de nouvelles quantités de substance nerveuse qui vont achever de retenir et de fixer solidement la toxine que nous voulions précisément mettre en liberté dans le corps de la souris.

Il en est de même pour l'encéphale. Nous ferons remarquer ici, à propos du cerveau, la contradiction, signalée par Wassermann et vérifiée par nous, entre le peu d'importance des phénomènes cérébraux dans le tétanos et l'action préservatrice si intense des grandes cellules de l'écorce cérébrale.

Tout intéressant que soit ce fait, constaté par Wassermann, de ce qu'il appelle « l'action antitétanique du système nerveux central », chez les animaux sains, une analyse plus soignée du phénomène nous montre combien il serait dangereux d'en faire une fonction d'une substance identique à l'antitoxine, celle qui se forme dans le sérum au cours de l'immunité artificielle.

Telle est cependant la déclaration de Wassermann. « La préservation du tétanos, dit-il, s'effectue dans un cas comme dans l'autre : elle reste efficace non seulement tant que la substance préservante circule dans l'organisme, mais encore plus tard, comme dans l'immunité antitoxique. Et mes expériences donnent ainsi un nouvel appui à la théorie d'Ehrlich, d'après laquelle l'antitoxine tétanique se formerait aux dépens des parties élémentaires de la moelle épinière¹. » Wassermann fait ici allusion aux expériences qui lui ont permis de prévenir l'intoxication tétanique en injectant une émulsion d'organes nerveux 24 heures avant la toxine, ou même d'empêcher le tétanos chez des animaux en leur injectant de l'émulsion nerveuse quelques heures après la toxine tétanique.

Et cependant, il suffit, comme nous allons le voir, d'intervenir, de façon en apparence minime, les facteurs de l'expérience, pour obtenir un résultat totalement différent.

Trois lapins de même poids reçoivent, l'un dans une patte antérieure, l'autre dans le flanc, le troisième sous la peau du dos,

1. WASSERMANN, *loc. cit.*

la même quantité de la même émulsion de cerveau frais de lapin. De plus, en même temps, ils reçoivent tous les trois au même point, c'est-à-dire sous la peau de la patte droite postérieure, 1/10 de milligramme, dose minima mortelle de toxine tétanique. Or ces trois lapins prennent le tétanos et en meurent le même jour que le témoin. Si, en se plaçant au point de vue de la théorie de Wassermann, on objecte que le contenu des cellules nerveuses a un pouvoir de diffusion plus lent que la toxine, on peut citer cette autre expérience dans laquelle l'injection de cerveau a été faite, d'un côté du corps, 24 heures avant l'inoculation de la toxine de l'autre côté, et l'animal a néanmoins présenté un tétanos mortel.

Il a donc suffi d'une très légère modification dans les facteurs de l'expérimentation pour changer du tout au tout le résultat.

Voilà qui montre donc qu'on ne saurait, en aucune façon, interpréter l'expérience de Wassermann dans le sens d'une fonction antitoxique, au sens vrai du mot.

Il suffira de rappeler ce qui se passe quand on expérimente avec le sérum antitétanique; si on injecte, en même temps, de la toxine dans une patte, et dans l'autre du sérum, l'animal présente tout d'abord quelques signes légers de tétanos, mais ils ne tardent pas à se dissiper complètement, dès que le sérum a pu effectuer sa diffusion dans l'organisme.

De cette analyse de l'expérience de Wassermann, dont il serait prématuré de vouloir donner dès maintenant une interprétation, on peut déjà conclure qu'une action de contact, entre les éléments nerveux et la toxine tétanique, est indispensable à la réussite du phénomène.

LOIS GÉNÉRALES DE L'ACTION DES DIASTASES

PAR E. DUCLAUX.

Dans leur action sur les substances qu'elles transforment, les diastases obéissent à des lois générales que nous avons intérêt à connaître, et qui, jusqu'ici, sont restées un peu confuses. Cette question a été en effet beaucoup étudiée, mais on ne peut pas dire qu'elle soit résolue. Elle est hérissée en ce moment de solutions contradictoires entre lesquelles il nous faudra choisir, si nous voulons faire autre chose que de les enregistrer avec résignation ou indifférence. Or ce choix est difficile. Nous aurons, pour nous guider, d'abord la confiance qu'il y a une loi, et que par conséquent toutes les expériences qui se traduisent par une courbe irrégulière ou en zigzag ont été troublées par des causes d'erreur inconnues et sont à rejeter. Nous pourrions en éliminer d'autres dont l'auteur ne s'est pas suffisamment mis en garde contre des influences latérales qu'il ignorait ou dédaignait, et que nous savons aujourd'hui être très puissantes, celle de la lumière par exemple, ou celle des microbes. Il se trouve que, cette ventilation faite, il reste peu de chose sur le crible, mais il en reste assez pour pouvoir établir un commencement de théorie de l'action des diastases : c'est ce que je voudrais essayer de montrer.

Comparaison avec l'action des acides. — Éliminons d'abord une assimilation, qui a été souvent faite, entre l'action des diastases et celle des acides. Sous le prétexte que les acides et les diastases sont souvent capables de produire les mêmes transformations et leur donnent la même allure, on a parfois appliqué, sans autre formalité, aux actions diastasiques, les lois trouvées pour l'action des acides. Celles qui président à l'interversion du sucre sont par exemple assez bien connues par les travaux de Wilhelmy (1), d'Ostwald (2) et d'autres savants. On les a considérées comme

représentant aussi l'action de la sucrase. Il importe de repousser de suite cette assimilation.

Étudions pour cela ce qu'il serait juste d'appeler la *loi de Wilhelmy*. Elle revient à ceci. La quantité de sucre qui s'intervertit à chaque instant dans une solution sucrée traitée par un acide est proportionnelle à la quantité de sucre présente à l'instant considéré. Cela veut dire que si la quantité de sucre présent devient double, la quantité de sucre intervertie dans l'unité de temps deviendra double aussi, alors qu'on laisse constantes les autres conditions de l'expérience, nature du milieu, température et dose d'acide. *La quantité de sucre intervertie dans l'unité de temps, ou la vitesse de la réaction, augmente donc proportionnellement à la quantité de sucre pour une même dose d'acide.* Cet acide proportionne son effort au travail à accomplir, et, théoriquement, dans les mêmes conditions d'acidité et à la même température, des solutions sucrées différentes s'intervertissent dans le même temps, quelle que soit leur richesse en sucre.

Voilà la notion exposée en langage ordinaire. Le langage mathématique permet de lui donner plus de précision et de la pousser plus loin. Soit S la quantité de sucre existant à l'origine dans un volume connu, par exemple dans 100 c. c. d'une liqueur qu'on intervertit par l'action d'un acide. Soit s la quantité qui existe encore au bout d'un temps t , compté à partir du commencement de l'expérience, qui est supposée s'accomplir constamment à la même température. La loi de Wilhelmy nous dit que la variation Δs du sucre pendant le temps Δt est proportionnelle à s . Si le temps Δt est suffisamment court, elle est aussi proportionnelle à Δt , de sorte qu'on peut écrire, en faisant précéder la variation Δs du signe —, pour montrer que la quantité de sucre diminue lorsque le temps augmente,

$$-\Delta s = ms\Delta t$$

où m est la quantité de sucre qui s'intervertirait, dans l'unité de temps, dans une solution sucrée contenant l'unité de poids de sucre dans le volume pris pour unité, et cela dans les mêmes conditions de milieu, de température, et d'acidité, que celles de l'expérience. On tire de là, facilement, en désignant par l le logarithme népérien

$$ls = -mt + C$$

C étant une constante qu'on détermine facilement en écrivant qu'à l'origine de l'expérience, pour $t = 0$, la liqueur contenait S de sucre. On a donc

$$\begin{aligned} 1S &= C \\ \text{d'où,} \quad 1S - 1s &= 1 \frac{S}{s} = mt \\ t &= \frac{1}{m} 1 \frac{S}{s} \end{aligned}$$

On voit tout de suite, sur cette valeur de t , que toutes les phases de l'hydrolyse de solutions sucrées inégalement concentrées s'accompliront dans le même temps, que par exemple elles mettront toutes le même temps à s'intervertir à moitié, c'est-à-dire à arriver au moment où

$$s = \frac{S}{2}$$

On aura en effet,

$$\frac{S}{s} = 2 \text{ et } t = \frac{1}{m} 12$$

Toutes ces réactions marcheront donc du même pas, et, commencées en même temps, se finiront au même moment : c'est ce que nous avons vu plus haut. Mais nous pouvons en plus, ici, mesurer la valeur de m , en évaluant le temps que met une dissolution sucrée à s'intervertir à moitié par exemple. On a alors

$$m = \frac{1}{t} 12$$

et l'expérience montre en effet que cette valeur de m est indépendante de la quantité de sucre, lorsque l'acidité est la même. De là une première conclusion qui a pu servir d'argument pour rapprocher les acides des diastases : les solutions de sucre les plus concentrées peuvent être interverties par des quantités relativement très faibles d'acide. Les acides jouissent donc de la puissance d'action quasi indéfinie que possèdent les diastases.

D'autres expériences ont montré que la valeur de m croît à peu près proportionnellement à la concentration de l'acide, c'est-à-dire à la quantité d'acide contenue dans l'unité de volume. L'unité de mesure la plus commode dans la pratique, pour évaluer la concentration, est la solution d'une quantité d'acide égale à son poids moléculaire évalué en grammes, dans un litre d'eau. Des

concentrations égales correspondent à des volumes égaux d'eau de chaux ou d'un autre alcali nécessaires pour la saturation. On trouve alors que la valeur de m croît un peu plus vite que la concentration pour les acides forts, un peu plus lentement pour les acides faibles.

En admettant une proportionnalité exacte, on peut écrire $m = na$, expression dans laquelle a représente la concentration de l'acide évaluée comme plus haut, en grammes-molécules, et n représente la quantité de sucre qu'interviendrait dans l'unité de temps, et dans les conditions de l'expérience, dans une solution contenant l'unité de poids de sucre par unité de volume, l'unité de concentration de l'acide employé.

Cette quantité n est ce qu'on nomme la *constante d'inversion*. Ostwald l'a déterminée en faisant agir, à 25°, 10 c. c. de solutions normales de divers acides sur 10 c. c. de solutions contenant de 30 à 40 % de sucre. Voici les valeurs numériques de n pour quelques acides, et leurs rapports avec celle de l'acide chlorhydrique supposée égale à 100, et prise comme terme de comparaison.

Acide bromhydrique . . .	24.4	111.4	Acide diglycolique	0.59	2.7
— chlorique	22.6	103.5	— méthylglycolique . .	0.40	1.8
— chlorhydrique	21.9	100 »	— citrique	0.38	1.7
— nitrique	21.9	100 »	— glycérique	0.38	1.7
— éthylsulfurique . . .	21.9	100 »	— formique	0.34	1.5
— éthylsulfonique . . .	19.9	91.2	— méthylacétique . . .	0.30	1.4
— trichloracétique . .	16.5	75.4	— éthylglycolique . . .	0.30	1.4
— sulfurique	11.7	53.6	— glycolique	0.28	1.3
— dichloracétique . . .	5.9	27.1	— malique	0.28	1.3
— oxalique	4.0	18.6	— lactique	0.23	1.1
— pyrotartrique	1.42	6.5	— oxyisobutyrique . . .	0.23	1.1
— phosphorique	1.36	6.2	— succinique	0.12	0.5
— monochloracétique	1.06	6.2	— acétique	0.09	0.4
— arsénique	1.05	4.8	— isobutyrique	0.07	0.3
— malonique	0.67	3.1			

On voit que les constantes d'inversion sont très variables avec les divers acides, et même que le caractère minéral ou organique joue un rôle assez effacé. L'acide sulfurique vient par exemple après l'acide trichloracétique, et l'acide phosphorique après l'acide oxalique. L'acide acétique se montre d'autant plus puissant, d'un autre côté, qu'on introduit davantage de chlore dans sa molécule, et, en moyenne, les acides organiques sont moins actifs que les acides minéraux. Concluons donc de ce qui précède que si les divers acides ont pour caractère commun de ne

pas tenir compte du poids de sucre présent et de l'intervertir dans le même temps, quelle que soit sa quantité, ils diffèrent beaucoup entre eux par l'activité qu'ils mettent à ce travail, et le temps qu'ils y consacrent. Ce sont donc là des forces qui sont très différentes de celles que nous connaissons et que nous sommes habitués à manier. D'ordinaire, deux forces qui produisent le même effet mécanique dans le même temps sont dites égales. Deux quantités du même acide, qui intervertissent dans le même temps des quantités très inégales de sucre, peuvent aussi être égales pondéralement. Deux quantités de deux acides différents peuvent être égales au point de vue pondéral ou quant au nombre des molécules, et cependant se montrer très inégales au point de l'interversion. Telles sont, en laissant pour le moment de côté l'influence de la température, les lois générales de l'interversion par les acides.

Condition d'une étude précise des diastases. — Si nous voulons maintenant comparer l'action des diastases à celle des acides, la première condition est de s'adresser aux actions diastasiques faciles à mesurer avec précision. Cette condition en élimine un grand nombre, toutes celles, par exemple, qui s'adressent à la fibrine, à l'albumine, à la cellulose, bref, aux matières dont la composition initiale n'est pas bien connue, et dont par suite les transformations nous échappent. L'amidon est mieux connu dans sa nature; on connaît assez bien aussi le maltose et la dextrine qui proviennent de ses transformations sous l'action de l'amylase. Mais les divers amidons ne se ressemblent pas, et les diverses parties d'un même granule d'amidon ne se ressemblent pas davantage, comme l'a montré Guérin-Varry, il y a 60 ans. Cette circonstance élimine aussi, dans une certaine mesure, l'action de l'amylase. Avec des diastases coagulantes, la marche de l'action est impossible à étudier. Les diastases oxydantes sont encore trop mal connues. Il ne reste guère que les diastases qui, comme l'émulsine, donnent des dislocations dont les termes sont connus et faciles à étudier. Mieux encore, la sucrase se prête à une recherche précise, parce qu'on sait préparer du sucre pur, dont peut suivre la transformation, soit au moyen de la liqueur de Fehling, soit au polarimètre. Cette étude a précisément été faite d'une façon très soigneuse, par MM. O'Sullivan et Thompson (3),

dont nous n'accepterons pas toutes les conclusions, mais dont les déterminations numériques méritent toute confiance.

Expériences de MM. O'Sullivan et Tompson. — Pour étudier la rapidité de l'action de la sucrase sur le sucre de canne, on commençait par faire dissoudre celui-ci dans l'eau chaude, qu'on laissait ensuite refroidir à la température à laquelle on voulait opérer. Cette liqueur sucrée, convenablement acidulée, était ensuite mélangée rapidement à une solution de sucrase préalablement portée à la même température. L'intervention commençait. Pour en suivre la marche, on prélevait une certaine quantité de

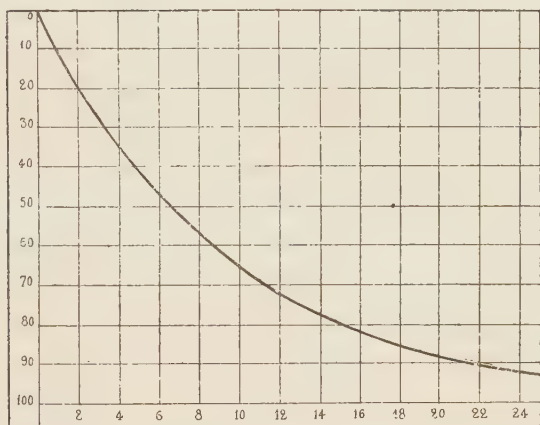


Fig. 1.

liquide qu'on versait immédiatement dans un verre contenant une goutte d'une solution concentrée de potasse ou de soude, cela suffit pour arrêter l'inversion. Deux points sont à signaler dans ce mode opératoire : en premier lieu, la dose d'acide sulfurique ajoutée n'était pas quelconque; c'était celle qui donnait au phénomène son maximum d'activité, et on la déterminait par une opération préliminaire. En second lieu, la lecture au polarimètre ne se faisait qu'après avoir laissé un quart d'heure de repos au liquide alcalinisé. Ces deux précautions opératoires ont de l'importance, mais pour des raisons que nous n'avons pas à développer ici.

Cette méthode permettait donc de déterminer divers points

de la courbe d'inversion. MM. O'Sullivan et Tompson ont recommencé l'expérience à diverses températures, en présence de quantités variables de sucrase. Ils ont fait varier aussi la concentration de la liqueur sucrée, la dose d'acide, etc. Ils ont toujours trouvé que la courbe obtenue, rapportée à deux axes dont l'un mesurait les quantités de sucre, et l'autre les temps, était une logarithmique, et pouvait s'appliquer presque exactement sur une logarithmique théorique (fig. 1) tracée avec la condition de ne coïncider avec la courbe expérimentale qu'en deux points, au départ, et en un point quelconque du parcours. Quand la coïncidence avait lieu en ces deux points, elle avait lieu partout.

MM. O'Sullivan et Tompson ont vu quelque chose de plus, c'est que toutes les courbes obtenues, ramenées à la même échelle, c'est-à-dire amenées à coïncider au départ et en un point de leur parcours, s'appliquaient aussi les unes sur les autres, ce qui prouve que la loi du phénomène est toujours la même, quelles que soient les circonstances de milieu et de température, à la condition seule que toutes ces circonstances soient maintenues constantes pendant la durée du phénomène.

Toutes ces propriétés, découvertes par l'expérience, s'accordaient très bien avec les propriétés théoriques de la courbe que fournit la loi de Wilhelmy :

$$t = \frac{4}{m} \log \frac{S}{s}$$

Cette courbe est une logarithmique, bien définie quand on donne la valeur de S pour $t = 0$, c'est-à-dire le point de départ de la courbe, et un autre point, c'est-à-dire la valeur de t pour une valeur connue de $\frac{S}{s}$, ce qui permet de connaître m . On comprend donc que O'Sullivan et Tompson aient considéré leurs expériences comme confirmatives du raisonnement qui nous a conduit plus haut à cette équation, et en aient présenté comme démontré le point de départ, à savoir que l'action de la diastase est, toutes choses égales d'ailleurs, proportionnelle à la quantité de sucre présent dans la liqueur, et croît ou décroît avec elle.

Expériences de Duclaux. — C'était l'assimilation complète avec l'action des acides. Mais nous avons un autre moyen, moins dé-

tourné que l'étude de la courbe, de savoir si cette assimilation est possible. Mettons, comme je l'avais déjà fait en 1883 (4), une même quantité de sucrase, 20 milligrammes par exemple, dans 100 c. c. de solutions contenant 10, 20 et 40 0/0 de sucre, et exposons le tout à une température de 37° : nous observerons que, pendant les premières heures de l'action, les quantités de sucre interverti dans l'unité de temps ne seront pas du tout, comme dans le cas des acides, inégales, et proportionnelles aux nombres 1, 2 et 4, c'est-à-dire aux quantités de sucre présentes dans la liqueur. Elles seront au contraire égales, à quelques milligrammes près, ce qui prouve qu'une quantité déterminée de sucrase produit son effet, toujours le même, sans se préoccuper, comme les acides, de la quantité de sucre présente autour d'elle, et agit comme une force constante qui, pendant un temps donné, ne peut produire qu'un travail déterminé.

Il est vrai qu'elle n'accomplit pas toujours le même travail. Dans les liqueurs ci-dessus, il y a, au bout de quatre heures à 37°, environ 5 grammes de sucre interverti. Si on avait mis la même quantité de diastase dans 100 c. c. de liquide ne contenant que 5 gr. de sucre, on aurait trouvé un résidu assez notable après le même temps; c'est que, pour une cause que nous aurons à étudier, l'action se ralentit à mesure qu'elle se complète. Mais, au début, elle marche du même pas, quelle que soit la quantité de sucre présente, et par conséquent n'est pas proportionnelle à la quantité de sucre, comme l'avaient trop hâtivement conclu MM. O'Sullivan et Tompson.

Expériences de Dubourg. — Ce n'est pas seulement la sucrase qui se comporte ainsi. M. Dubourg (5) a retrouvé les mêmes propriétés pour l'amylase de l'urine. En la mettant en contact avec de l'empois d'amidon à 50°, et en mesurant après 2 heures et après 24 heures les quantités de glucose formées, il a trouvé les chiffres suivants, exprimés en grammes, pour des quantités d'amidon allant croissant comme les nombres de la première colonne.

Quantités d'amidon	Glucose apr. 2 h.	Glucose apr. 24 heures
1 gr.	0,34	1,71
2 —	0,33	1,73
3 —	0,34	1,70
4 —	0,32	1,72
5 —	0,36	1,70
8 —	0,30	1,75
10 —	0,37	1,72

La constance de ces nombres est remarquable en ce qu'elle se maintient pour deux intervalles de temps pendant lesquels l'action a été en se ralentissant de plus en plus, et ici encore nous trouvons qu'une quantité déterminée d'amylase produit toujours le même effet, quelle que soit la quantité d'amidon avec laquelle on la met en contact.

Il faut donc renoncer à l'hypothèse qui a servi de base aux calculs de MM. O'Sullivan et Tompson, et qui semblait vérifiée par leurs résultats. Il faut accepter leur conclusion, parce qu'elle est conforme à l'expérience, et repousser leurs prémisses, parce qu'elles sont en contradiction avec elle. La chaîne du raisonnement se rompt donc quelque part, et ce point de rupture est facile à signaler. C'est quand MM. O'Sullivan et Tompson admettent que, seule, leur hypothèse conduit à une logarithmique. En réalité, beaucoup d'autres hypothèses conduisent à des courbes de même forme. Pour choisir entre elles, il faut opérer à l'inverse de MM. O'Sullivan et Tompson ; il faut les soumettre d'abord à l'expérience, puis les introduire dans une équation, si l'expérience les justifie, et chercher si elles conduisent à une logarithmique.

Réaction des produits formés sur l'action de la diastase. — Une diastase qui hydrolyserait dans un temps donné une quantité constante de sucre, comme nous ont paru le faire, au début de l'action, les diastases étudiées plus haut, donnerait une réaction régulière : la quantité de sucre irait par exemple en décroissant proportionnellement au temps, et la réaction serait terminée au bout d'un temps facile à calculer, étant connue la quantité m de sucre, qu'intervertit, dans l'unité de temps, et dans les conditions de l'expérience, la quantité de diastase sur laquelle on opère. Dans un temps t , la quantité de sucre intervverti serait mt , et si S était

la quantité de sucre initiale, la réaction serait terminée au bout d'un temps T tel qu'on ait $S = m T$, d'où

$$T = \frac{S}{m}$$

L'expérience est entièrement en désaccord avec cette conclusion. La réaction n'est jamais celle qui résulte de cette hypothèse ; très active au début, elle se ralentit toujours à la fin, et le temps de l'action est toujours beaucoup plus long que celui qui résulte de l'équation que nous venons d'écrire.

Il faut donc qu'à l'action uniforme de la diastase se superpose une action retardatrice. Comme on s'attache à ne troubler en rien le phénomène, on ne voit guère, *a priori*, d'autre cause perturbatrice que celle qui pourrait provenir des produits de la réaction. Essayons donc par l'expérience si ces produits ont une action réellement retardatrice.

Il n'y a pour cela qu'à faire, avec la même quantité de diastase et dans les mêmes conditions de température et de milieu, deux expériences comparatives, dont l'une ne contiendra que la matière sur laquelle la diastase doit agir, et l'autre cette matière additionnée des produits auxquels donne lieu la réaction. Si ceux-ci ont une action retardatrice, la seconde transformation devra s'accomplir plus lentement que la première.

Or, c'est toujours ce qui arrive, et non seulement ce fait a été observé depuis longtemps, mais il a été tout de suite rapporté à sa véritable cause. Payen (6) avait remarqué que l'action de la diastase sur l'empois d'amidon, qui, en général, ne se termine pas et s'arrête à un niveau déterminé, allait beaucoup plus loin lorsqu'on faisait disparaître peu à peu, en le soumettant à une fermentation alcoolique, le maltose formé. Payen ne se préoccupait pas, dans son explication, de l'action possible de la levure, et son interprétation a pu être légitimement contestée par MM. O'Sullivan et Kjeldahl. Mais elle est exacte dans ses traits généraux, ainsi que l'ont montré les expériences de M. Lindet.

Dans un moût de grains, saccharifié à refus par la diastase, ce savant ajoute, à 62°, la quantité de chlorhydrate de phénylhydrazine et d'acétate de soude nécessaire pour précipiter non seulement le maltose déjà formé, mais encore tout celui qui pourrait provenir de la saccharification ultérieure du résidu que

la première digestion a laissé inattaqué. La moitié environ de ce résidu disparaît dans ces conditions nouvelles.

Dans une autre expérience portant aussi sur un moût saccharifié à refus, on divise les liquides en deux parties égales dans lesquelles on précipite des quantités inégales de maltose par la phénylhydrazine. En ajoutant à ces deux moitiés des quantités égales de diastase, on voit la saccharification reprendre dans les deux, et marcher plus vite et aller plus loin dans celui dans lequel on a précipité le plus de maltose.

En s'adressant à des substances plus faciles à faire disparaître d'une liqueur que les glucoses, on rencontre les mêmes résultats. Ainsi, par exemple, dans l'action de l'émulsine sur la salicine, il se forme de la saligénine qui est soluble dans l'éther, et qu'on peut enlever en agitant avec ce réactif le liquide diastatifère. De même pour l'alcool coniférylique produit par l'action de l'émulsine sur la coniférine. Il existe sur ce point deux expériences de Tammann (10). Dans l'une, de la salicine, mise à 26° en présence d'émulsine, avait été hydrolysée dans la proportion de 83 0/0 et ne dépassait pas ce chiffre; on agite le liquide avec un tiers de son volume d'éther, pour enlever la saligénine. 24 heures après, la totalité de la salicine avait disparu. Dans une autre expérience, faite toujours à 26°, la proportion de coniférine hydrolysée, qui n'avait pu dépasser 42 0/0, a atteint en 24 heures le chiffre 60 0/0, à la suite d'un traitement à l'éther.

On peut, du reste, au lieu d'enlever les matières produites par la réaction, ce qui l'active, ajouter à l'avance ces matières préparées ailleurs, ce qui la retarde. Toutes ces expériences aboutissent à la même conclusion : c'est que les produits de la réaction ont une influence retardatrice.

Comme ils augmentent naturellement à mesure que la réaction avance, leur influence augmente aussi, et nous sommes naturellement conduits à nous demander si ce n'est pas à cette influence retardatrice qu'est dû le retard croissant de la réaction, et la lenteur qu'elle met toujours à se terminer. Nous pouvons même aller plus loin et remarquer que l'introduction de cette force retardatrice doit nous conduire à la même courbe logarithmique que celle sur laquelle MM. O'Sullivan et Tompson ont appuyé leur argumentation.

Traçons en effet (fig. 2) la courbe représentative de la loi de décroissance du sucre en prenant comme abscisses les temps écoulés depuis le commencement de l'expérience, et pour ordonnées les quantités de saccharose encore présentes à chaque instant. La courbe part du point S, représentatif de la quantité de saccharose initiale, s'abaisse ensuite, rapidement d'abord, plus lentement vers la fin de l'action. A un moment quelconque T, la quantité de saccharose non encore transformé est $TM = s$, et la quantité de sucre déjà interverti peut être représentée par $MI = S - s$; cela posé, la loi de la courbe, si c'est une loga-

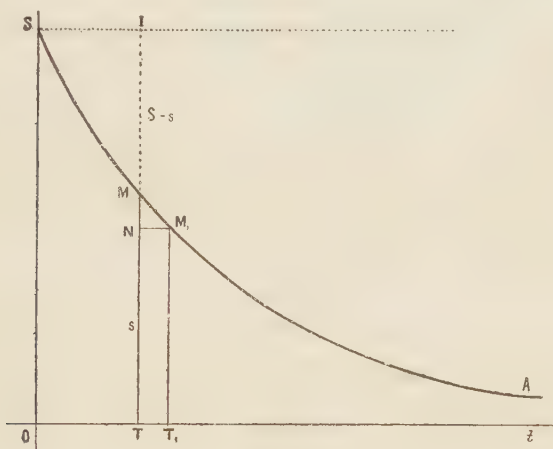


Fig. 2.

rithmique, est que la décroissance MN de l'ordonnée, quand on passe du temps T au temps T_1 , est proportionnelle à la longueur de cette ordonnée, ce qui veut dire, en revenant aux notions concrètes, que la diminution dans la quantité de saccharose est proportionnelle à la quantité de saccharose présent dans la liqueur. C'est donc, dans cette conception, l'influence décroissante des quantités de sucre non transformé qui commande la forme de la courbe. Or, cette influence retardatrice pourrait être remplacée par l'influence retardatrice des quantités croissantes de sucre interverti, car, la somme $MT + MI$ étant constante, la loi de décroissance de MT est la même que la loi de croissance de MI . La logarithmique tracée expérimentalement par MM . O'Sullivan et Tompson s'accommode donc tout

aussi bien de la première conception que de la seconde, qui a l'avantage d'être seule d'accord avec l'expérience.

Le langage mathématique permet de préciser ces notions générales, et nous allons pouvoir arriver, en prenant toujours l'expérience pour guide, à une formule de l'action des diastases, autre que celle que nous avons donnée plus haut pour les acides et plus d'accord avec les faits.

Soit à intervertir une solution sucrée contenant une quantité S de saccharose par unité de volume. Appelons m la quantité de sucre que transformerait, dans l'unité de temps, dans les conditions et à la température de l'expérience, la quantité de sucrase employée. Nous savons qu'au début de l'expérience, lorsque l'influence des produits de la réaction est nulle ou encore faible, l'action a tous les caractères d'une action constante, et que les quantités de sucre interverti sont les mêmes pendant le même temps, quelle que soit la quantité de sucre. Nous pouvons alors écrire que la diminution $-\Delta s$ de la quantité de sucre, si elle ne dépendait que de l'action de la diastase, serait proportionnelle au temps, et qu'on aurait

$$-\Delta s = m \Delta t.$$

L'influence des produits de la réaction est retardatrice, et intervient pour diminuer la quantité m , qui sans cela serait constante, d'une fraction croissante avec la quantité $(S-s)$ de sucre interverti, et qu'on peut, dans une première approximation, lui supposer proportionnelle. En appelant n un facteur qui dépend non de S , mais des conditions extérieures qu'on maintient constantes, et qu'on peut dès lors supposer aussi constant, au moins dans une même expérience, la quantité m est donc diminuée de la quantité $mn(S-s)$, et devient

$$m - mn(S-s) = m [1 - n(S-s)]$$

On a donc, si nos hypothèses sont exactes,

$$-\Delta s = m [1 - n(S-s)] \Delta t.$$

Ici, une première vérification s'impose. Si cette équation est exacte, Δs devient égal à zéro, ce qui veut dire que la réaction s'arrête lorsqu'on a

$$1 - n(S-s) = 0,$$

$$\text{d'où} \quad S - s = \frac{1}{n}$$

Ceci revient à dire que dans aucune expérience d'intervention de sucre, la quantité de sucre interverti ne pourrait dépasser un certain nombre $\frac{1}{n}$. Cette conclusion est entièrement en désaccord avec la réalité. L'expérience apprend en effet, comme nous l'avons vu, que toute intervention commencée se termine, si on lui en laisse le temps. Il y a, il est vrai, des transformations diastatiques qui ne sont jamais complètes. Mais l'expérience apprend à leur sujet qu'elles s'arrêtent, non pas lorsque la quantité absolue de matière transformée est constante, comme le voudrait l'équation ci-dessus, mais lorsque la proportion de matière transformée est constante, ce qui est tout différent.

Je ne prendrai pas d'exemple dans l'action diastatique la plus connue sous ce rapport, celle de l'amylase sur l'empois d'amidon, parce que les conditions de l'action sont un peu trop complexes. Mais on peut en demander à l'action de l'émulsine sur divers glucosides. Je trouve par exemple, dans le travail de Tammann visé plus haut, des chiffres qui ont été recueillis pour un autre objet, mais qui n'en sont que plus probants pour la thèse que je soutiens. Tammann a fait agir, à 46°, une même quantité d'émulsine sur des quantités de salicine croissantes comme les nombres 1, 2, 4, 8 et 16, et a trouvé que, au bout de 16 heures et de 24 heures, les proportions de salicine hydrolysée atteignaient les chiffres suivants

Salicine employée	Salicine hydrolysée	
	ap. 16 heures.	ap. 24 heures
0,188	94,2 0/0	94,2 0/0
0,376	94,4	94,3
0,752	94,4	94,5
0,503	94,5	94,4
3,007	94,4	94,4

L'action ne s'arrête donc pas lorsqu'il y a une quantité constante, mais une proportion constante de salicine décomposée. Comme c'est la même quantité d'émulsine qui a agi partout, elle était certainement en excès dans les solutions de salicine les plus pauvres, mais l'action n'a pas été poussée pour cela plus loin. Mêmes conclusions pour des solutions de coniférine qui ont été traitées par l'émulsine.

Coniférine employée.	Coniférine hydrolysée	
	ap. 16 heures.	ap. 24 heures.
0,377	42,3	42,3
0,500	42,0	42,0

Ce sont donc les *proportions* qui paraissent jouer, quand il s'agit des diastases, le rôle que jouent les quantités absolues quand il s'agit des acides. C'est là une notion qui peut paraître étrange, et nous fait sortir de nos habitudes d'esprit. Mais si l'expérience l'impose, il faudra bien s'y habituer. Nous sommes confirmés dans cette vue en nous rappelant l'expérience de p. 103, dans laquelle nous avons vu que la même quantité de sucrase, qui donnait 5 grammes de sucre interverti en 4 heures dans des solutions contenant 10, 20, 40 grammes de sucre, en donnait moins dans une solution qui n'en contenait que 5 grammes dans le même volume. C'est que la proportion $\frac{S-s}{S}$ du sucre interverti au sucre initial était plus considérable dans cette dernière solution que dans les autres. Nous sommes donc conduits par l'expérience à modifier notre première conception, et à remplacer, dans l'équation écrite plus haut, la quantité $S - s$ par la fraction $\frac{S-s}{S}$ et à écrire

$$- \Delta s = m \left(1 - n \frac{S-s}{S} \right) \Delta t.$$

Cette fois, il y a concordance avec l'expérience. La réaction s'arrête lorsque

$$1 - n \frac{S-s}{S} = 0$$

d'où $\frac{S-s}{S} = \frac{1}{n}$

et la valeur de n est même facile à calculer, on a en effet, pour l'émulsine et la salicine

$$\frac{1}{n} = \frac{94,4}{100} \text{ d'où } n = 1,06$$

De même pour l'émulsine et la coniférine

$$\frac{1}{n} = \frac{42}{100} \text{ d'où } n = 2,39$$

Enfin pour les réactions qui, comme celles de la sucrase sur le saccharose, se terminent toujours, on a $s=0$, d'où $n=1$.

Ici se présente une remarque intéressante. Pour ces réactions, c'est-à-dire quand $n=1$, l'expression de Δt se simplifie, et devient.

$$-\Delta s = \frac{ms}{S} \Delta t$$

Si on la compare avec l'expression correspondante écrite plus haut au sujet de l'action des acides, on voit qu'elles ne diffèrent que par l'introduction du rapport $\frac{1}{S}$. La diminution de la quantité de sucre dans le temps Δt n'est donc pas proportionnelle à la quantité absolue de sucre, comme dans le cas des acides, mais proportionnelle à la proportion de sucre dans la liqueur. Par suite nous n'aurons pas, comme dans le cas des acides, des actions qui s'accompliront dans le même temps, quelle que soit la dose de sucre, mais des actions qui, étant d'autant plus lentes à chaque instant que les quantités de sucre sont plus fortes, iront en augmentant de durée proportionnellement à la dose de sucre.

On peut du reste préciser cette notion et la généraliser en se servant du calcul, qui permet, par des voies simples et régulières, de passer de l'équation écrite ci-dessus, et qui exprime une relation entre des quantités infiniment petites, à l'expression des valeurs finies de S et de t . On a en effet, en appelant comme plus haut s la quantité de sucre non encore transformé au temps t .

$$S - s = \frac{S}{n} \left(1 - e^{-\frac{mnt}{S}} \right)$$

et

$$t = \frac{S}{mn} \ln \frac{1}{1 - n \frac{S-s}{S}}$$

On voit, dans ces équations, d'abord que nous aboutissons, comme nous pouvions nous y attendre, à une logarithmique comme avec l'hypothèse de MM. O'Sullivan et Tompson. Dans le cas où $n=1$, la dernière équation peut s'écrire

$$t = \frac{S}{m} \ln \frac{S}{s}$$

et ne diffère de celle que nous avons écrite plus haut (p. 98) que par l'apparition du facteur S , qui n'existait pas dans le cas de l'action des acides, et qui nous assure qu'ici la durée de l'action croît proportionnellement à la quantité de sucre. D'une manière générale, si on a plusieurs actions diastasiques marchant parallèlement

dans les mêmes conditions avec des quantités égales de diastases et des quantités différentes de sucre, les temps nécessaires pour arriver à des proportions égales $\frac{S-s}{S}$ de sucre transformé

seront proportionnels aux quantités de sucre présentes, et il en sera de même naturellement pour les durées totales de l'action.

Il est à remarquer que les durées de l'action totale sont toujours données comme infinies par le calcul, qu'il s'agisse des acides ou des diastases. Comme, dans une logarithmique, la diminution de l'ordonnée est toujours proportionnelle à l'ordonnée, elle ne se réduit jamais à zéro. La courbe est asymptote à l'axe des x , et ne le rencontre qu'à l'infini. Mais pratiquement la réaction est terminée quand nos méthodes analytiques deviennent incapables d'en apprécier le progrès, et par conséquent, pratiquement, la transformation a toujours une fin.

Mesure des constantes m et n. — Nous sommes donc arrivés à des équations qui nous permettent de comparer à chaque instant les nombres que fournit l'expérience à ceux que fournit le calcul, et par conséquent de voir si les hypothèses que nous avons introduites dans cette étude sont d'accord avec les réalités.

Elles se rapportent toutes aux valeurs données à m et à n . Voyons comment on peut calculer ces constantes dans chaque expérience. Pour n , la chose est déjà faite. Nous savons qu'il suffit d'étudier la réaction lorsqu'elle est à terme, c'est-à-dire lorsqu'elle est arrivée à la limite qu'elle ne peut pas dépasser, dans les conditions de température et de milieu dans lesquelles on opère. La valeur de n est égale à 1 dans toutes les actions qui s'achèvent, et plus grande que l'unité dans toutes celles qui aboutissent à une limite. C'est donc l'action terminée qui nous donne n ; c'est l'action à ses débuts qui va nous donner m .

Considérons en effet l'action à ses débuts, au moment où le facteur $n(S-s)$ est encore négligeable. Pendant quelque temps l'action progresse proportionnellement au temps, et on a

$$-\Delta s = m \Delta t$$

La valeur de m a, dans ces conditions, une représentation géométrique très simple. Soit en effet SA (fig. 3) la courbe de l'inter-

version. Dire que l'ordonnée diminue proportionnellement au temps, c'est dire qu'à l'origine, sur une certaine longueur SM , la courbe se confond avec une ligne droite ST . On voit alors que

$$m = -\frac{\Delta s}{\Delta t} = -\frac{S s}{s M} = \operatorname{tg} \alpha$$

en appelant α l'angle de la droite ST avec l'axe des temps. Il est d'ailleurs évident que la droite ST est la tangente à la courbe, à son origine. Nous arrivons donc à cette conclusion que la valeur du coefficient m , qui, seul, dans l'équation de la



Fig. 3.

logarithmique, mesure l'action de la diastase, est la tangente de l'angle que fait avec l'axe des temps la tangente à l'origine de la courbe d'intervention.

Le tracé empirique d'une tangente comporte toujours beaucoup d'incertitude, surtout sur une courbe déterminée par points. Il arrive heureusement, d'ordinaire, que la courbe se confond assez longtemps avec sa tangente pour qu'on puisse déterminer deux ou plusieurs points du parcours commun, ce qui revient à dire que l'action à ses débuts reste proportionnelle au temps pendant une période suffisante pour que l'on puisse faire plusieurs déterminations. Si elles sont concordantes, c'est-à-dire si elles s'échelonnent sur une même droite, le tracé de cette droite sera facile. On sera d'ailleurs averti du moment où intervient

l'influence perturbatrice des produits de la réaction par celui où la courbe se détachera nettement de la tangente à l'origine.

On trouve, disséminées dans divers mémoires, même dans ceux qui ne les cherchaient pas, des preuves de cette proportionnalité de l'action au temps. Mayer (14) et moi (4) l'avons, je crois, observée les premiers indépendamment l'un de l'autre. Mayer s'est servi d'une solution très étendue de sucrase, qu'il a mélangée à une solution de sucre de canne à 10 0/0. On a déterminé immédiatement, puis à divers intervalles, les quantités totales de sucre interverti, et on en a déduit les quantités de sucre interverti par heure pendant chacun des intervalles considérés. L'expérience a donné les chiffres suivants :

Temps	Sucre interverti pour 100	
	en totalité	par heure
0	1	»
1 heure	1,6	»
17 h. 1/2	18,2	1,0
22 h. 1/2	23,4	1,0
44 h.	39,8	0,8
95 h.	66,2	0,5
120 h.	74,4	0,33
145 h.	83,2	0,33

On voit que, pendant les 20 premières heures, la quantité de sucre interverti par heure est à peu près constante, et que la proportionnalité n'existe plus dès qu'il y a environ 25 0/0 du sucre interverti. J'avais trouvé de mon côté que la limite était 8 0/0 pour des solutions à 30 et 40 0/0 de sucre. Mais l'important n'est pas le moment où la proportionnalité cesse, c'est qu'elle existe pendant une durée assez longue, pour qu'on puisse faire plusieurs observations concordantes propres à assurer la valeur de *m*.

Nous pouvons trouver, dans le mémoire cité d'O'Sullivan et Tompson, un autre exemple, intéressant parce que la transformation y a été rapide. Les nombres qui suivent se rapportent à l'inversion, à 15°, 5, d'une solution à 20 0/0 de saccharose, convenablement acidulée. Le tableau donne les intervalles des prises et les proportions de sucre interverti.

Au début	0, % de sucre interverti	
ap. 5 minutes	3,4	—
15 —	9,8	—
30 —	19,2	—
57 —	33,6	—
90 —	45,8	—
120 —	58,5	—
150 —	67,4	—
210 —	79,8	—
240 —	84,4	—
270 —	87,3	—
430 —	95,1	—
1470 —	99,2	—
48 heures	100,0	—

Nous avons donné la série à peu près complète des déterminations comme exemple d'une étude bien faite, et pour montrer qu'une action qui marche vite à ses débuts peut être longue à se

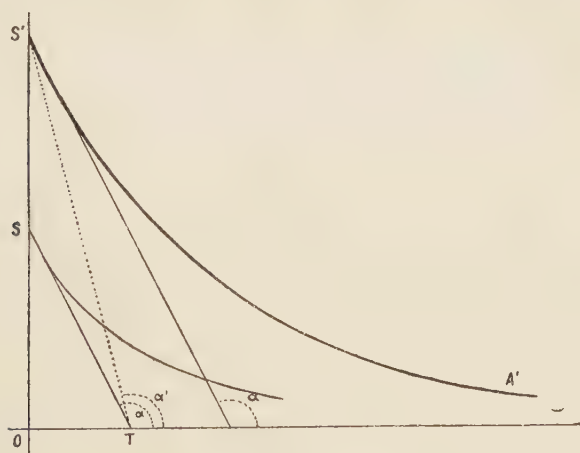


Fig. 4.

terminer. Pour le moment, nous ne prenons de ces chiffres que les premiers, qui montrent que pendant la première demi-heure, et jusqu'à ce qu'il y ait eu environ 20 0/0 de sucre interverti, l'action a été à peu près proportionnelle au temps.

La quantité de sucre intervertie par minute dans les conditions de l'expérience qui précède, ou la valeur de m , est facile à calculer. La liqueur contenait par 100 c. c. 20 grammes de saccharose dont 3,4 0/0, soit 0 gr. 62, ont été intervertis pendant

les 5 premières minutes ; cela donne 0 gr. 124 par minute. On trouverait de même 0 gr. 13 pour le premier quart d'heure, 0 gr. 128 pour la première demi-heure. Puis les nombres décroissent de plus en plus, mais ils sont assez bien déterminés pour cette première période. Nous pouvons donc désormais tabler sur une détermination assez précise de la valeur de m . Elle est ici égale à 0 gr. 127.

Influence de la quantité de diastase. — En simplifiant, comme nous venons de le faire, l'étude de l'action d'une diastase, et en la réduisant à celle de l'inclinaison d'une droite sur l'axe des temps, nous allons pouvoir rendre intuitives quelques notions importantes que le calcul viendra du reste confirmer.

Soit ST (fig 4) la tangente à l'origine de la courbe d'intervention d'une quantité OS de la saccharose. Le point T auquel elle vient couper l'axe des temps est la durée t qu'aurait le phénomène s'il n'était pas troublé par l'intervention des produits de la réaction, et s'il marchait constamment avec sa vitesse originelle. On a en effet

$$m = tg \alpha = \frac{OS}{OT} = \frac{S}{t}$$

Imaginons maintenant que, sans rien changer à la température et aux conditions de l'expérience, nous ayons opéré sur un poids de sucre double, dissous dans la même quantité de liquide et avec la même quantité de diastase. Notre courbe partira d'un point plus élevé S' , tel que $OS' = 2 OS$. Et comme l'action d'une diastase au départ ne dépend que des conditions extérieures, qui sont restées les mêmes, et non de la dose de sucre, qui seule a varié, la tangente à l'origine aura même inclinaison que la première, et viendra rencontrer l'axe du temps à une distance $OT' = 2 OT$. Ceci, remarquons-le, n'est pas un fait nouveau, c'est une autre forme de la notion que l'action d'une diastase ne dépend pas de la quantité de sucre.

Mais imaginons maintenant que nous ayons doublé la quantité de diastase en même temps que celle du sucre. Dans ce cas, nous pouvons supposer que nous avons mis, dans le même volume de dissolvant inerte, deux doses de sucre et de diastase égales à celles de la première expérience. Nous avons donc deux actions parallèles, confondues dans le même milieu, et si nous admet-

tons, ce qui est très vraisemblable, qu'elles ne s'influencent pas l'une l'autre, chacune d'elles, et par conséquent l'action totale doit s'accomplir dans le même temps t que précédemment. L'inclinaison au départ de la tangente à l'origine doit donc être telle qu'elle vienne passer par le point T. Ce sera la droite S'T. Donc, en doublant, pour une même quantité OS' de sucre, la quantité de diastase, nous avons réduit à moitié le temps de l'action, et doublé la valeur de m , car tout à l'heure, pour S'T', nous avions

$$m = \frac{OS'}{OT'} = tg\alpha$$

et nous avons pour S'T

$$m' = \frac{OS'}{OT} = 2m, \text{ ou bien } tg\alpha' = 2tg\alpha.$$

Pour des quantités égales de sucre, la valeur de m double donc quand la quantité de diastase devient double. En généralisant, on voit que m est proportionnel à la quantité de diastase, et qu'en appelant maintenant a la quantité de sucre que peut intervertir, dans les conditions et à la température de l'expérience, une unité de poids ou de volume, arbitrairement choisie, de la diastase employée, une quantité d de cette diastase, évaluée au moyen de cette unité, en intervertira la quantité ad . On aura donc :

$$m = ad$$

et pendant le commencement de l'action, de même que pendant toute sa durée quand l'action perturbatrice des produits de la réaction n'intervient pas, on a

$$S = mt = adt$$

en appelant S la quantité de sucre transformée pendant la période à laquelle s'applique la loi de proportionnalité signalée plus haut. Pendant cette période, le produit de la quantité de diastase d par la durée t de l'action est donc constant pour des quantités égales de matière transformée.

Généralisation de ces résultats. — J'ai dit plus haut que j'avais particularisé mon raisonnement pour le rendre plus simple et plus intuitif. Mais je n'ai pas besoin de dire qu'on arrive à des conclusions analogues ou identiques, en étudiant non plus la tangente à l'origine, mais la courbe elle-même. Le coefficient angulaire de la tangente à l'origine de la courbe

$$S - s = \frac{S}{n} \left(1 - e^{-\frac{mnt}{S}} \right)$$

est en effet m , comme nous pouvions nous y attendre, pour $t = 0$.

Quant au temps de l'action, donné par l'équation :

$$t = \frac{S}{mn} \ln \frac{1}{1 - n \frac{S - s}{S}}$$

on peut avoir avec lui des relations plus générales que celles que nous avons tirées tout à l'heure, mais d'accord avec elles. On voit en effet que, pour diverses interversions faites avec des quantités inégales de sucre et de diastase, à la seule condition que la valeur de $\frac{S - s}{S}$ soit la même, et que n soit constant, on a, en appelant A une constante

$$t = \frac{AS}{m}$$

Les durées d'action qui correspondent à des progrès égaux dans la marche de l'action sont donc proportionnels aux quantités de sucre pour les mêmes quantités de diastase; ils sont en raison inverse des quantités de diastase pour les mêmes quantités de sucre. Ceci revient à dire que si on fait marcher simultanément, et dans les mêmes conditions, plusieurs actions diastasiques avec des quantités égales de diastase et des quantités inégales de sucre, on pourra, au lieu de mesurer le temps total de l'action, ce qui est long et parfois difficile, se contenter de mesurer le temps au bout duquel une fraction quelconque de l'action est accomplie, ce qui simplifie et facilite les mesures. Dans leurs recherches sur la sucrase, MM. O' Sullivan et Thompson ont choisi le moment où la rotation de la liqueur, d'abord droite, passe par le zéro en devenant négative. Ce terme correspond, ainsi qu'il est facile de le calculer, à l'interversion de 74,1 0/0 du sucre présent, et on pourra faire, en prenant cette limite et ce terme de comparaison, toutes les évaluations de m que nous faisons plus haut en comparant entre elles les inclinaisons des tangentes à l'origine sur l'axe du temps.

Vérifications expérimentales. — Nous sommes donc maintenant en possession de quelques conclusions théoriques établies sur nos hypothèses, et des moyens de les contrôler. Essayons cette

vérification. Le nombre des expériences faites dans cette direction est malheureusement très restreint. Ce n'est pas qu'il n'en ait été fait beaucoup. Mais ou bien elles pèchent par défaut de comparabilité, ou bien elles ont été faites avec une méconnaissance complète des conditions qui pouvaient les rendre probantes.

C'est ainsi par exemple que Tammann (10) ne pouvait rien trouver en cherchant une relation entre la quantité de diastase et la quantité de substance hydrolysée à la fin de la réaction. D'abord, le caractère essentiel des diastases est de pousser à bout l'action qu'elles produisent, quelle que soit leur quantité, si on leur en donne le temps. De ce côté-là, par conséquent, le terrain de l'étude était mal choisi. Puis, en revenant à nos formules, si m dépend de la quantité de diastase, la quantité de substance intacte à la fin de la réaction dépend de n , qui n'a avec m aucune relation nécessaire, et on comprend l'incohérence des résultats obtenus par Tammann. D'autres mémoires se prêteraient à des critiques pareilles. Quand on a fait cette ventilation nécessaire, il ne reste plus que quelques expériences, assez probantes cependant pour qu'il ne reste aucun doute sur l'exactitude des lois posées ci-dessus.

Influence de la quantité de sucre. — Chose curieuse, c'est la plus facile à étudier, celle qui relie le temps de quantités égales d'action, ou de l'action totale, aux quantités de sucre, qui est la plus mal appuyée par l'expérience. Barth (11) a trouvé, en faisant agir de la sucrase sur du saccharose, des nombres irréguliers qui, au lieu de suivre une marche régulière à mesure qu'augmentait la quantité de sucre, passaient par un maximum. Peut-être ne s'est-il pas assez méfié des légères doses d'alcali que le sucre apporte dans les solutions, et qui, lorsqu'on prend des liqueurs concentrées, peuvent devenir assez fortes pour troubler l'action de la diastase.

En somme, je ne connais pas d'expérience dans laquelle on ait mis, dans des conditions tout à fait comparables, une même quantité de sucrase en présence de quantités inégales de sucre, et où on ait noté une proportionnalité entre la dose de sucre et la durée des réactions. Tout ce qu'on peut affirmer, comme résultant de toutes les expériences faites, c'est que la durée de

la réaction n'est pas indépendante de la quantité de sucre, comme dans le cas des acides, mais augmente avec lui.

Heureusement, cette loi de proportionnalité n'est autre chose, ainsi que nous l'avons vu, qu'une autre forme d'un fait bien établi, je veux dire l'égalité entre les quantités de sucre interverti que donne dans le même temps, au début de l'expérience, la même quantité de sucrase dans des solutions de sucre inégalement concentrées. La tangente au départ des diverses courbes d'interversion a la même inclinaison sur l'axe des temps, et doit venir le rencontrer à des distances de l'origine proportionnelle aux quantités de sucre initiales. D'un autre côté, si n est constant à une même température, comme nous allons le montrer tout à l'heure, la loi qui se vérifie pour les tangentes à l'origine doit se vérifier aussi pour les courbes réelles d'interversion, de sorte que nous pouvons considérer la loi comme sûre.

Influence de la quantité de diastase. — Cette influence a été beaucoup étudiée, mais pas toujours dans des conditions qui rendent l'étude fructueuse. Brucke a fait, par exemple, agir sur de la fibrine des quantités différentes de suc gastrique; mais il est difficile de trouver, dans ce cas, une mesure de l'action qui se produit. De même, Schwarzer a fait agir du malt sur de l'empois, et a employé, comme critérium du degré d'avancement de l'action, l'iode qui, comme on le sait, est un réactif infidèle. Cohnheim a été mieux inspiré en recourant à la mesure de la quantité de glucose formé. C'est à Paschutin (12) qu'on doit la première démonstration d'une proportionnalité à peu près exacte entre les quantités de diastase et les quantités d'action dans le même temps.

Il a fait agir des quantités différentes de salive sur une solution sucrée, et a trouvé les nombres suivants :

Salive employée.	Sucre produit.
0,25 c. c.	0,40 grammes.
0,50 —	0,82 —
0,75 —	1,21 —
1,00 —	1,55 —
1,50 —	2,16 —
5,00 —	2,57 —

On voit que tant que l'action reste à ses débuts, la quantité

de sucre produit reste proportionnelle à la quantité de diastase. Cette loi ne se vérifie pas pour toute la durée de la réaction, mais nous savons qu'elle ne peut plus être vraie dès qu'intervient l'action perturbatrice des produits formés. Ce qu'il faut alors comparer, ce ne sont pas les quantités d'action pendant le même temps, mais les durées de quantités d'action égales. C'est pour avoir oublié cette notion essentielle que Kjeldahl, Mayer, ont échoué dans leurs tentatives pour mettre en évidence cette proportionnalité. C'est parce que MM. O'Sullivan et Tompson avaient adopté le mode d'évaluation signalé plus haut qu'ils ont pu vérifier la loi dans des limites beaucoup plus étendues.

Ils ont en effet mesuré, aux températures de 15°,5 et de 56°,5, les durées nécessaires pour qu'une solution de sucre arrive au zéro dans l'appareil de polarisation, en présence de quantités variables de sucrase. Ce passage par le zéro correspond, nous l'avons dit, à l'interversion de 74 0/0 du sucre. Voici les nombres qu'ils ont obtenus : en A, ce sont les nombres bruts, évalués en minutes; en B, on trouve les produits des deux nombres qui représentent la quantité de sucrase et la durée de l'action. Les solutions sucrées étaient acidulées de façon à donner l'action la plus rapide possible.

Température.	Sucrase.	A		B	
15°,5	0,15 grammes.	283	minutes.	424,5	
» »	0,45 —	94,8	—	426,6	
» »	1,50 —	30,7	—	460,5	
56°,5	0,0345 —	157,6	—	54,4	
» »	0,0722 —	74,8	—	54,0	

On voit que, surtout pour la température de 56°, le produit mt de la quantité de diastase par la quantité d'action est constant. Or, quand, comme dans ce cas, il y a eu intervention des produits de la réaction sur sa marche, il faut, d'après l'équation

$$mt = \frac{S}{n} \cdot 1 - \frac{1}{1 - n \frac{S-s}{S}}$$

pour que le produit mt soit constant pour des quantités $\frac{S-s}{S}$ d'action égale, que n le soit aussi. Voilà donc vérifiées deux des hypothèses sur lesquelles nous avons basé toutes nos déductions.

Étude de la présure. — Cette proportionnalité inverse entre la dose de diastase et la quantité d'action se vérifie très bien aussi, et sans tant de difficultés, pour la présure : elle se vérifierait sûrement aussi pour les autres diastases coagulantes, parce que, avec elles, les produits de la réaction ne peuvent l'entraver, puisqu'ils prennent l'état solide. La difficulté est de trouver un terme défini à la réaction. Avec le lait, on y arrive assez facilement quand on le coagule dans des tubes à essai ou des flacons allongés. Le lait forme, une fois coagulé, une masse solide qui reste adhérente au vase quand on le renverse. Dans un vase plat, le moment de la coagulation peut être aussi exactement apprécié en enfonçant dans la masse la lame d'un couteau ou le doigt. La boutonnière formée doit avoir des lèvres nettement coupées, et le liquide qui s'y réunit doit être transparent. Quand on opère à température constante, et qu'on ajoute à du lait des quantités inégales de présure, on obtient pour la durée de la coagulation des chiffres variables dont l'expérience suivante donne une idée.

Dans mes expériences (15), la présure employée était de la présure de Hansen, de Copenhague. On en a mis la même quantité, 1 c. c., dans les volumes de lait indiqués, en c. c., dans la première colonne. La seconde donne les durées de coagulation de ces mélanges divers à la température de 36°,5. La troisième donne le produit *mt* de la proportion de diastase par le temps de coagulation.

Valeurs de <i>m</i> .	T. de coagulation.	Produit <i>mt</i> .
1/24,000	240 minutes.	100
1/12,000	44 —	275
1/8,000	30 —	266
1/6,000	24.30"	270
1/4,000	15'	266
1/3,000	11'	275
1/2,000	7.30"	266
1/1,500	6.20"	240
1/500	4.20"	120
1/250	3.30"	80
1/175	3.20"	40

On voit que la loi se vérifie bien pour des volumes de lait compris entre 2,000 et 12,000 fois le volume de présure, mais qu'en deçà et au-delà de ces limites, elle cesse d'être exacte. Cela

tient à des causes diverses connues sur lesquelles je reviendrai. Pour le moment, ce qui doit nous frapper, c'est que la loi se vérifie d'une façon aussi précise pour une action diastasique aussi différente de celle des diastases hydrolysantes.

Lærcher (13) est arrivé aux mêmes résultats en ajoutant à du lait des solutions étendues de présure, employées aux doses de 0,01 c. c. à 1 c. c., dans 10 c. c. de lait chauffé et maintenu à 37°. Voici les nombres obtenus rangés en série. La série de gauche est obtenue avec des proportions de présure décuples de celle de droite, et on a calculé pour chacune des expériences le produit *mt*.

Doses de présure	Temps de coagul.	Produit <i>mt</i>	Doses de présure	Temps de coagul.	Produit <i>mt</i>
0,01 c. c.	non obs.		0,1 c. c.	43	430
0,02	245 min.	490	0,2	24,5	490
0,03	155	465	0,3	16	480
0,04	126,5	485	0,4	12,5	500
0,05	92	460	0,5	10	500
0,06	78	468	0,6	8,75	525
0,07	69,25	485	0,7	8,16	561
0,08	63	504	0,8	7,5	600
0,09	56	504	0,9	6,7	603
0,10	43	430	1,0	6	600

Il y a dans ces nombres des irrégularités singulières, le phénomène étant certainement régulier et continu, mais on voit encore que, dans la zone moyenne, pour des proportions de présure qui ne sont ni trop fortes ni trop faibles, la loi se vérifie bien.

Expériences de O'Sullivan. — Nous pouvons enfin donner une vérification en bloc de la formule générale

$$t = \frac{S}{m} \frac{1}{n} \frac{1}{1 - n \frac{S-s}{S}}$$

en recourant à des expériences de O'Sullivan (7) faites dans des conditions où on ne pouvait pas s'attendre, *a priori*, à voir une telle loi apparaître. Ce savant a observé, et c'est un point sur lequel nous reviendrons, qu'une levure de Bass fraîche et saine, mise en suspension dans l'eau, n'y laisse pas transsuder de sucrase, ou presque pas. Mise en contact avec une solution de sucre, elle l'intervertit pourtant, et même avec quelque rapidité ; mais cette intervention est un phénomène intracellulaire, ou au moins ne

s'accomplit qu'au contact de la cellule, car si on filtre le mélange avec assez de soin pour qu'aucun globule de levure ne traverse le filtre, toute inversion s'arrête dans le liquide filtré. Il ne contient donc pas de sucrase soluble. De plus, pendant les premières heures du contact de la levure et du sucre, il n'y a pas d'alcool produit. On peut donc admettre que tout se passe comme si, en introduisant de la levure dans de l'eau sucrée, on y introduisait autant de centres d'action diastasique qu'il y a de cellules. En maintenant celles-ci en suspension par un courant d'air, qu'on peut du reste remplacer par un courant d'acide carbonique, on assure leur égale répartition dans le liquide et l'homogénéité du système. La levure hydrolyse peu à peu le sucre à l'aide de la diastase toute faite qu'elle contient, et ne semble pas en fabriquer de nouvelle dans un liquide où elle ne rencontre que du sucre. Quoi qu'il en soit, on voit apparaître, dans ces conditions nouvelles et singulières, la loi écrite plus haut.

Elle se simplifie en ce que, pour le sucre et la sucrase, la valeur de n , comme nous l'avons vu, est égale à l'unité. On a donc l'équation

$$t = \frac{S}{m} \log \frac{S}{s}$$

Chose curieuse, M. O'Sullivan ne songeait pas à vérifier cette formule dans ses essais, mais bien la formule

$$t = \frac{1}{m} \log \frac{S}{s}$$

à laquelle le conduisait sa conception du phénomène (p. 102). Il a donc mesuré, à divers intervalles, t , S , s , et de ces mesures il a tiré les valeurs de m . Dans sa conception, et d'après sa formule, ces valeurs eussent dû croître avec la proportion de levure, et être indépendantes des doses de sucre comme elles le sont dans le cas des acides. Il trouve au contraire, et il remarque lui-même qu'elles varient en raison inverse des quantités de sucre, la quantité de levure étant la même, de sorte qu'on a

$$m' = \frac{m}{S}$$

C'est donc en réalité la formule que nous avons proposée qui ressort de l'expérience, et non celle de O'Sullivan.

Pour donner une idée de l'approximation avec laquelle elle se vérifie, nous allons citer les résultats de deux expériences

comparatives faites avec la même levure, mise en contact avec des solutions de sucre à des titres variés : 5, 10, 20, 30 0/0. Dans chacune de ces liqueurs, on mettait 0 gr. 5 et 1 gramme de levure, qu'on maintenait en suspension à l'aide d'un courant d'air. Au bout de 30, 60, 120 minutes, on prélevait un échantillon qu'on étudiait au polarimètre. On avait donc pour chaque cas t , S , s , et on en tirait, pour chaque expérience, trois valeurs assez concordantes de m'

$$m' = \frac{4}{t} \log \frac{S}{s}$$

C'est la moyenne de ces valeurs de m' qui est donnée ci-dessous pour les 3 liqueurs sucrées additionnées de 0 gr. 5 et de 1 gramme de levure.

Séries	Sucre 5 0/0	Levure 0gr,5	Valeur de m'	Valeur de $m's = m$
I	5 0/0	1 gr.	0,0027	0,000135
		4 gr.	0,0037	0,00028
	10 0/0	0gr,5	0,0013	0,000130
		1 gr.	0,0026	0,00026
	20 0/0	0gr,5	0,0007	0,000140
		1 gr.	0,0012	0,00024
X	30 0/0	0gr,5	0,00035	0,000105
		1 gr.	0,0006	0,00018
	5 0/0	0gr,8	0,0045	0,00022
		0gr,8	0,0022	0,00022
	10 0/0	0gr,8	0,0010	0,00020
		0gr,8	0,0010	0,00020

On voit que la loi apparaît nettement au travers de la complication de l'expérience et de la délicatesse des mesures. La quantité m croît proportionnellement à la quantité de levure ou de diastase. La vérification est moins bonne pour les solutions sucrées à 30 0/0. Mais O'Sullivan remarque que pour cette concentration, la cellule de levure se contracte et réduit son volume de $1/5$ environ. En outre la liqueur est visqueuse. Il n'est donc pas étonnant que l'action diastasique faiblisse dans ce cas. Ce qui est étonnant, c'est qu'une loi faite et écrite pour une réaction entre des substances solubles se retrouve aussi exacte pour une réaction où entrent des cellules vivantes. Ceci nous prouve que tout ce qui précède est vrai, non seulement dans le domaine de la chimie, mais dans celui de la physiologie, et qu'il y a des échanges cellulaires qui peuvent se comporter comme des réactions purement chimiques.

Expériences de Moritz et Glendinning. — Enfin, je signalerai une dernière conséquence, d'accord à la fois avec la théorie et avec l'expérience. Supposons que dans une action diastasique où n est plus grand que l'unité, et où la valeur maximum de $S - s$ est donnée comme plus haut, par l'expression :

$$\frac{S - s}{S} = \frac{1}{n}$$

on ajoute, une fois la réaction arrêtée à ce terme, une quantité nouvelle de la substance transformable par la diastase. Il est clair que la réaction va reprendre, et que la portion T ajoutée va se transformer jusqu'à ce qu'il en reste une quantité finale t telle que :

$$\frac{T - t}{T} = \frac{1}{n}$$

de sorte que la réaction s'arrêtera de nouveau à son terme initial, si on maintient constantes les conditions dans lesquelles elle s'accomplit du commencement à la fin. On a donc ici le fait curieux d'une diastase qui reste inerte aussi longtemps qu'on voudra, dans la première partie de l'expérience, alors qu'il reste encore la quantité s de matière à transformer, et qui recommence à agir lorsqu'on lui donne à digérer de nouvelle matière en tout analogue à s .

C'est au moins ce qui résulte de nos formules. Or la réalité du fait résulte d'une foule d'observations déjà faites, parmi lesquelles je relèverai comme les plus concluantes celles de MM. Moritz et Glendinning sur la saccharification de l'amidon. Une fois cette saccharification à terme à une température quelconque, par exemple 52°, ils la partagent en deux moitiés dont l'une est réservée pour l'analyse. Dans l'autre, ils mettent une quantité d'empois d'amidon égale à celle qu'elle contenait primitivement, et recommencent la saccharification à 52°. Il n'y a de diastase que la moitié de celle qui existe primitivement, et qui semblait inerte. La saccharification recommence pourtant. Au bout de 2 heures on opère sur ce second liquide comme sur le premier, c'est-à-dire avec le quart de la diastase initiale, et le quart de l'empois d'amidon initial. Les saccharifications deviennent de plus en plus lentes, car la diastase travaille de plus en plus en présence des produits de son action, mais elles aboutissent au même terme, ainsi que le montrent les chiffres

suivants, qui sont les pouvoirs réducteurs de la matière en solution dans les liquides, rapportés à ce qu'ils seraient si cette matière était du dextrose. Toutes les corrections ont été faites pour le sucre apporté par le malt, et les autres petites causes d'erreur du procédé opératoire :

1 ^{re} conversion	48,7
2 ^e — (faite avec la première).	48,6
3 ^e — (faite avec la seconde)..	48,4

En résumé, il m'a paru que les formules que je propose comprenaient et expliquaient tous les faits connus. Elles sont en outre assez simples, malgré leur complication apparente, et en outre elles reposent sur des notions faciles à saisir. C'est pour cela que je les propose avec confiance aux savants que préoccupent les difficiles questions de diastase, qui ont englobé l'étude des toxines et des venins, et n'en sont devenues que plus urgentes à résoudre.

BIBLIOGRAPHIE

1. WILHELMY. — *Pogg. Ann.* 1^{re} S., t. 81, p. 413.
2. OSTWALD. — *Journ. f. prakt. Chemie*, II^e S., t. 29, p. 285.
3. O'SULLIVAN ET TOMPSON. — Invertase, contribution à l'histoire d'un enzyme. *Journ. of chem. Soc.*, t. 2, 1890.
4. DUCLAUX. — *Microbiologie*, p. 163, 1883.
5. DUBOURG. — L'amylase de l'urine. Thèse de Paris, 1889.
6. PAYEN. — *Ann. de ch. et de phys.*, IV^e S., t. IV, p. 286.
7. O'SULLIVAN. — *Journ. of chem. Soc.*, t. 324, p. 493.
8. KJELDAHL. — *Comptes rendus du laboratoire de Carlsberg*, p. 148, 1879.
9. LINDET. — Observations sur la saccharification par la diastase. *Comptes rendus de l'Ac. des sciences*, 4 mars 1889.
10. TAMMANN. — Sur les ferments non figurés. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift*, 1892.
11. BARTH. — *Ber. d. d. chem. Gesellsch.*, t. 11, p. 474.
12. PASCHUTIN. — *Reichert's, Dubois-Reymond Archiv.*, 1871, p. 359.
13. LORCHER. — Über Labwirkung. — *Pflüger's Archiv.*, t. 99, 1897.
14. MAYER. — *Enzymologie*, 1882.
15. DUCLAUX. — Mémoire sur le lait. *Annales de l'Institut agronomique*, 1879-1880.
16. MORITZ ET GLENDINNING. — Note on diastatic action, *Journal of the chem. Soc.*, 1892, p. 689.

LES MICROBES DES NODOSITÉS DES LÉGUMINEUSES

PAR M. MAZÉ

Préparateur à l'Institut Pasteur.

TROISIÈME MÉMOIRE

DEUXIÈME PARTIE

Morphologie du microbe des nodosités.

Dans le cours des recherches déjà publiées¹, qui ont surtout porté sur le côté chimique de la fixation de l'azote, je n'ai rencontré pendant longtemps que la forme bacillaire mobile des microbes des nodosités. Les auteurs ont décrit des formes ramifiées, des formes en étoile associées aux bacilles. Je ne les ai vues apparaître qu'en présence d'un taux élevé de chlorure de sodium ou d'une dose exagérée de saccharose. Ce caractère accidentel semble traduire des conditions de développement défavorables.

Je me suis proposé de préciser ces conditions et d'essayer en même temps d'obtenir les formes en poire que l'on rencontre dans les nodosités de trèfle. Dans ce but, j'ai eu recours : 1° à l'action de la chaleur ; 2° aux milieux acides.

Action de la chaleur. — M. Laurent a fixé à 30° la limite du développement des microbes des nodosités. Cependant, si on fait desensemencements abondants, ils poussent encore à 35° sur gélose² ; ils s'habituent même assez vite à cette température.

Si on réensemence toutes les 48 heures les cultures exposées pendant quelques jours à 35°, on observe, dès le deuxième passage, dans les cultures âgées de 24 heures, de nombreux bacilles pourvus de bourgeons latéraux ; ces ramifications disparaissent dans les cultures âgées de 3 jours, lorsque la mucosité est déjà abondante.

1. *Ces Annales*, février 1897 et janvier 1898.

2. La gélose dont il est question dans toute la dernière partie de ce travail a été faite avec du bouillon de haricots additionné de 3 0/0 de saccharose.

A partir du deuxième passage, les formes rameuses deviennent de plus en plus nombreuses; elles diminuent ensuite et disparaissent complètement lorsque le microbe s'est adapté à la température de 35°. C'est dans les cultures de 24 heures qu'elles sont le plus nombreuses. Les figures 1 et 2, Pl. II, donnent une idée de leur richesse et de leur abondance. Comme on le voit, les bacilles s'allongent et forment un grand nombre de bourgeons; si on dilue un peu de ces cultures riches en formes ramifiées dans de l'eau physiologique ou du bouillon de haricots stérile, on les voit se désagréger rapidement et donner naissance, par voie de division transversale, à des éléments simples. La fig. 3, Pl. II, représente deux de ces formes à deux stades différents de division. Les rameaux prennent naissance et grandissent comme les bourgeons ordinaires; il n'y a donc pas, chez les microbes des nodosités, de division longitudinale.

Action des acides. — Les microbes ne se cultivent pas dans le bouillon de haricot additionné de 1/1000 d'acide tartrique; les germes déposés dans ce milieu ne se régénèrent plus au bout de 2 à 3 semaines, lorsqu'on les transporte sur des milieux alcalins.

Ils se développent sur gélose additionnée de 1 0/00 d'acide tartrique ou oxalique ¹, à condition, toutefois, d'ensemencer très abondamment. Dès la première culture sur ce milieu, les bacilles donnent naissance à des formes en poire, à la température de la chambre; leur contenu est vacuolaire, leur diamètre atteint 2-3 μ , quelquefois plus (fig. 2, Pl. I).

Ces métamorphoses sont générales lorsque l'ensemencement est pauvre; mais si on transporte beaucoup de mucosité, la transformation est limitée à la minorité des microbes; dans le premier cas, le développement s'arrête au bout de 3 ou 4 jours et les formes en poire persistent dans la culture, tandis qu'elles sont passagères lorsque la mucosité envahit toute la surface.

Si on combine l'action de la température de 35° avec l'influence des milieux acides, les résultats sont différents: les bacilles s'allongent, se renflent en chapelets et se ramifient. Tous se transforment; il est impossible de trouver dans les cultures un bacille normal; l'organisme qu'on obtient ainsi présente la

1. L'acidité n'atteint pas le chiffre de 1/1000, car la gélose étant préparée avec une eau légèrement calcaire, une partie de l'acide se trouve neutralisée.

plus grande analogie avec des fragments de mycélium âgé d'une culture d'oospora (fig. 3, Pl. I).

Mais il est impossible de fixer ces formes ; elles disparaissent au bout de quelques jours dans la culture même, lorsque la mucosité devient assez abondante ; si on les transporte sur gélose alcaline, elles se désagrègent très vite, et au bout de 24 heures on obtient un bacille typique, chez lequel rien ne trahit les modifications que ses ancêtres ont subies.

On obtient encore des formes analogues à celles de la fig. 3, Pl. I, lorsqu'on ensemence sur de la gélose de viande peptonisée un microbe habitué au bouillon de haricots sucré.

Rien n'est donc plus facile que d'obtenir sur des milieux artificiels des formes aussi variées que celles que l'on rencontre dans les nodosités. On ne peut pas attribuer celles-ci à l'action d'une température exagérée, mais il est clair qu'elles s'expliquent par l'influence de l'acidité de la sève.

La plante n'exerce aucune action spécifique en dehors de celle des acides ; j'ai déjà dit que les microbes pénètrent dans les racines sous forme de coccobacilles (V. p. 43) ; ils y conservent cet état tant que la sève ne circule pas en abondance dans le tubercule ; mais lorsque les vaisseaux sont formés dans cette région, le liquide nourricier dissout la mucosité protectrice qui englobe les microbes ; à partir de ce moment, ils nagent dans un liquide acide constamment renouvelé, et c'est alors que les formes rameuses apparaissent ; elles persistent aussi longtemps que dure la vie dans ces régions.

Autres formes physiologiques. — L'histoire morphologique des microbes des nodosités ne se borne pas à ce que je viens d'exposer. Pour observer les formes si variées que je viens de décrire, il faut faire usage de cultures récemment tirées de la pulpe de jeunes tubercules. Les cultures d'origine ancienne présentent aussi un certain nombre de particularités intéressantes que je vais passer maintenant en revue.

J'ai montré que le microbe des légumineuses ne se développe pas dans une atmosphère d'azote pur ; il y conserve cependant assez longtemps sa vitalité ; et si, au bout de 15 jours ou 3 semaines, on le reprend dans les tubes scellés pour l'ensemencer sur des tubes ordinaires, il donne de petites colonies grisâtres, constituées par une forme à peu près ronde, de très

petit diamètre. En goutte suspendue, ces microbes se présentent soit à l'état isolé, soit réunis par deux ou disposés en chaînes.

Ce résultat, obtenu dans une première expérience, laissait place au doute; il a été vérifié immédiatement dans une autre expérience faite avec des cultures dont la pureté avait été préalablement contrôlée.

La forme ronde a repris son aspect primitif au bout de quelques passages sur gélose, mais je n'ai pas réussi à lui faire produire de mucosité. Avec les cultures récentes on n'obtient pas ces transformations. Ensemencées dans une atmosphère d'azote, elles se comportent comme les cultures d'origine ancienne; mais les germes repris dans les tubes fermés, plusieurs semaines plus tard, ont conservé leurs propriétés caractéristiques.

Ceci prouve que les cultures entretenues par des rajeunissements répétés se différencient peu à peu sur milieux artificiels.

Si on en prend une appartenant à la même série que celles qui ont servi dans l'expérience précédente, et si on l'ensemence de façon à obtenir des colonies séparées, voici ce qu'on observe : au bout de deux ou trois jours, on voit apparaître une série de colonies blanches, nacrées, étalées sur le milieu; elles atteignent facilement 3-4 millimètres de diamètre. Puis, un à deux jours après, une autre série de colonies se forme; celles-ci sont plus proéminentes, légèrement jaunâtres; leur diamètre reste toujours inférieur à celui des premières. Les deux espèces de colonies renferment deux bacilles qu'il est impossible de distinguer lorsqu'ils sont intimement mélangés; mais quand on est prévenu, on remarque que les colonies jaunâtres sont constituées par un microbe dont le contenu présente de petites vacuoles.

Ensemencés séparément, ces deux bacilles ne fabriquent pas de mucosité; si on les associe, ils donnent des cultures caractéristiques. Dans un même tube, des colonies séparées conservent l'aspect de colonies de microbes banaux; si deux d'entre elles empiètent l'une sur l'autre, la mucosité se forme en cet endroit, et au bout de quelques jours elle envahit toute la culture. Il est donc impossible de considérer l'une ou l'autre de ces formes comme une impureté.

Les cultures sur pomme de terre permettent de pousser la transformation encore plus loin, à condition, toujours, de se

servir de cultures d'origine ancienne : sur un fragment de pomme de terre ensemencé depuis quatre semaines, on ne trouve plus que des formes rondes. On peut suivre au microscope l'évolution des bacilles; on les voit s'allonger et se diviser peu à peu en articles courts qui deviennent indépendants les uns des autres; si on ensemence des tubes de gélose avant que la transformation ne soit complète, et si on s'arrange de façon à obtenir des colonies séparées, on peut, à un moment donné, observer des colonies de formes rondes et des colonies de formes bacillaires.

En ensemencant séparément sur pomme de terre les deux bacilles que nous avons isolés précédemment, on les voit évoluer tous deux vers la forme ronde.

Les cultures issues des colonies provenant directement des nodosités, et conservées pendant huit mois, peuvent être rajeunies au bout de ce temps; elles montrent les mêmes transformations. L'une de ces cultures m'a fourni une forme ronde et un bacille qui, ensemencés à part, ne fabriquent pas de mucosité; si on les associe, ils donnent des cultures tout à fait typiques.

Propriétés physiologiques des formes précédentes. — Les propriétés physiologiques des microbes des nodosités ne sont pas plus stables que leurs caractères morphologiques. Le bacille des légumineuses, au moment où on l'isole des tubercules, ne liquéfie pas la gélatine; les formes rondes qui en dérivent la liquéfient très rapidement, les formes bacillaires très lentement; les microbes ne troublent pas la gélatine peptonisée; ils se réunissent au fond des tubes et forment un dépôt floconneux.

Leur action sur l'azote libre ou combiné est également intéressante. Pour l'étudier, j'ai eu recours aux deux formes extraites des cultures que j'ai conservées pendant huit mois sans les rajeunir; ces deux microbes sont très différenciés, et, de plus, lorsqu'on les associe, ils exercent l'un sur l'autre une influence très remarquable.

La forme bacillaire avait acquis spontanément, pendant la belle saison, la propriété de produire de la mucosité; pour cette raison, j'ai fait deux séries d'expériences correspondant à deux états différents de ce microbe. J'ai adopté le dispositif que j'ai déjà utilisé plusieurs fois.

On a mis en expérience six ballons de culture renfermant chacun 50 c. c. de bouillon de haricots.

Le ballon n° 1 a étéensemencé avec la forme ronde.

—	n° 2	—	—	la forme bacillaire primitive ¹ .
—	n° 3	—	—	les deux formes précédentes.
—	n° 4	—	—	la forme ronde.
—	n° 5	—	—	la forme bacillaire active.
—	n° 6	—	—	la forme ronde et la forme active.

Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus :

Cultures	Durée des cult.	S. initial	Sucre final	S. consommé	Az. final	Az. initial	Azote gagné
n° 1	14 jours	1500mgr	1111mgr	389mgr	15mgr,8	19mgr,5	— 3mgr,7
n° 2	14	id.	891	609	17,1	id.	— 2,4
n° 3	14	id.	757,5	625	21,7	id.	+ 2,2
n° 4	29	1750	1578	172	7,9	7,1	+ 0,8
n° 5	25	id.	927	823	9,3	id.	+ 2,2
n° 6	25	id.	1128	627	9,5	id.	+ 2,4

Les chiffres fournis par les nos 1, 2, 3, qui constituent la première série, sont très instructifs. Dans les deux premières cultures il s'est produit une déperdition d'azote; on est donc ici en présence de ferments de la matière azotée; ce caractère est d'autant plus prononcé que l'on se rapproche davantage de la forme ronde. La consommation de saccharose est à peu près inversement proportionnelle à la perte d'azote; celui-ci se dégage à l'état gazeux; des barboteurs à acide sulfurique convenablement placés sur le courant d'air ne retiennent pas de trace d'ammoniaque.

Lorsque les deux formes microbiennes sont associées, les résultats sont bien différents; en 14 jours, dans un milieu trop riche en azote initial, il s'est produit un gain de 2mgr,2 d'azote.

L'aspect des cultures concorde bien avec ces chiffres; les vases n° 1 et 2 renferment un bouillon très fluide; les microbes forment un dépôt pulvérulent qui se réunit dans les parties les plus déclives du fond. Le contenu du n° 3 est très épais, très riche en mucosité.

Dans la deuxième série, le n° 4 a conservé sa fluidité jusqu'au

1. J'appelle forme bacillaire primitive celle qui ne produit pas de mucosité, tandis que l'expression forme active correspond à l'état sous lequel elle en donne.

20^e jour. A partir de ce moment il est devenu visqueux ; ce changement dans l'aspect de la culture a coïncidé avec l'évolution de la forme ronde vers la forme bacillaire. Lorsqu'on a mis fin à cette expérience, les tubes de gélose ensemencés avec le contenu du ballon montraient au microscope deux bacilles mobiles, légèrement différenciés ; incapables de produire de la mucosité lorsqu'ils sont séparés, ils en élaborent lorsqu'ils sont associés. De plus, ces microbes ne provoquent plus de déperdition d'azote. Cette évolution vers la forme bacillaire active s'est faite sous l'influence d'une température favorable et d'une aération très active, car pendant ce temps, les formes conservées sur gélose ne se sont pas transformées. Il faut noter également l'influence de la composition du milieu de culture, très pauvre en azote combiné et très riche en saccharose.

Les chiffres relatifs au gain d'azote correspondent assez exactement, dans les deux autres cultures, aux propriétés des microbes qu'elles renferment. Le n^o 2 a consommé plus de saccharose pour produire à peu près le même travail, l'association de deux formes exerce donc encore une influence sensible sur le résultat final.

A ces deux séries d'expériences correspondent deux séries d'inoculations faites sur des vesces de Narbonne¹ ; les résultats obtenus dans cette voie reproduisent assez fidèlement ceux que l'analyse vient de fournir.

1. Cette légumineuse donne des nodosités 9 à 12 jours après l'inoculation. La graine est de la grosseur du pois le plus volumineux. Le testa, plus dur, permet de faire agir plus longtemps le sublimé et d'obtenir une stérilisation plus rigoureuse sans s'exposer à endommager l'embryon.

Comme mes recherches ont nécessité l'emploi d'un grand nombre de plantes poussant dans des solutions nutritives stériles, je donnerai ici le mode opératoire auquel je me suis arrêté.

Pour la stérilisation, j'ai eu recours au procédé ordinaire qui consiste : 1^o en lavages préalables à l'eau stérile ; 2^o séjour d'un quart d'heure dans le sublimé acide au 1/100, en récipient stérile ; 3^o 4 à 5 lavages à l'eau stérile en ballons stériles.

Les semences ainsi préparées sont réparties dans des tubes de 20 centimètres de longueur sur 2 de diamètre et remplis au 1/3 de leur hauteur d'eau distillée ; ces tubes sont munis de deux tampons de coton ; l'un, assez lâche, repose sur l'eau dans laquelle il est immergé en partie ; l'autre, plus serré, remplit le rôle ordinaire des tampons de coton. Le tube ainsi préparé est stérilisé à 120^o ; pour mettre la graine en germination, on la dépose avec une pince flambée sur le tampon de coton intérieur.

Au bout de 48 heures à la température de la chambre, en été, la racine sort ; elle traverse facilement le tampon de coton et va baigner dans l'eau distillée, pendant que la tige occupe le compartiment supérieur du tube ; celle-ci peut

La forme ronde et la forme bacillaire inoculées séparément ne donnent pas de tubercules. Il n'y a rien sur les racines qui rappelle les formations de cette nature ; mais les bacilles cultivent dans le feutrage des poils absorbants ; ils forment ainsi une gaine persistante qui entoure le corps de la racine et la grossit beaucoup ; on y trouve au microscope un bacille très fin, mobile, identique au point de vue de la forme à celui que l'on observe dans les jeunes nodosités à peine visibles à l'œil nu.

En fixant et en colorant la préparation, on voit, dans l'enchevêtrement des poils absorbants, des filaments fortement colorés ; en les décolorant modérément par l'alcool, on leur donne de la transparence et l'on peut distinguer nettement le bacille qu'ils renferment. La figure 6, Pl. I, représente un de ces filaments muqueux à un grossissement de 100 D avec quelques fragments de poils absorbants ; ils sont identiques à ceux de la figure 4 de la même planche, et comme eux ils ne diffèrent que par le volume du pseudo-mycélium qu'on observe dans les jeunes nodosités.

Les racines des plantes inoculées avec les deux formes microbiennes associées portent de très nombreuses nodosités ; celles-ci renferment des bacilles ramifiés ; elles sont aussi volumineuses que celles que produisent, dans les mêmes conditions, les microbes sortant de la pulpe des tubercules.

La seconde série d'inoculations a donné des résultats identiques aux précédents ; cette fois, par conséquent, l'harmonie n'est pas si complète avec les indications de la chimie. La forme bacillaire active est encore impuissante à produire des nodosités.

Une question s'impose maintenant à la suite de toutes ces expériences qui se confirment mutuellement. Les microbes des

acquérir une longueur de 7 à 8 cm. et développer deux ou trois feuilles, étiolées naturellement.

Lorsqu'il y a contamination, la graine a apporté des germes qui sont surtout des spores de moisissures, de mucors principalement ; les penicilliums et les aspergillus sont plus rares ; les microbes constituent l'exception. S'il y a des impuretés, la plante se développe mal et périt le plus souvent ; dans les tubes stériles, l'eau reste parfaitement limpide et les racines sont d'un blanc d'ivoire. Lorsqu'on a bien choisi ses graines, la contamination n'atteint pas plus du 1/20 des plantes en germination.

Quand la tige a 7 à 8 centimètres de longueur, on transporte la jeune plante dans un récipient stérile muni d'une solution nutritive, en prenant toutes les précautions pour opérer ce transfert d'une manière aseptique.

nodosités appartiennent-ils à deux espèces bacillaires, ou bien toutes ces formes résultent-elles d'une évolution graduelle d'une seule et même espèce ?

Il semble bien, par ce qui précède, qu'on se trouve en présence de deux espèces. Rien ne permet d'affirmer que lorsqu'on part d'une colonie obtenue avec un microbe sortant d'une nodosité, on ne prend pas, à son insu, les deux espèces simultanément ; elle peuvent se confondre longtemps par leurs caractères morphologiques, puis se différencier sous l'influence des agents de transformation ; et ce n'est qu'au moment où leurs caractères sont suffisamment distincts qu'on s'aperçoit qu'il y a en réalité deux espèces de formes et de propriétés bien tranchées, comme on l'a vu.

En observant attentivement le passage des formes rameuses des nodosités à la forme bacillaire des cultures, on remarque que les premières sont des colonies et non des individus. M. Franck avait déjà observé que chacune de ces formes met successivement en liberté plusieurs coccobacilles mobiles. Voici ce que j'ai vu à mon tour : les formes ramifiées des tubercules, transportées sur des tubes de gélose, se gonflent en une petite série de vésicules séparées par des étranglements qui prennent bien la couleur (fig. 1, Pl. I). Les vésicules ne se colorent pas ; ce sont des vacuoles dilatées par les courants osmotiques dus au changement de milieu ; elles se résorbent ou éclatent ; les granules protoplasmiques, mis en liberté, donnent naissance à autant de bacilles mobiles. Nous devons donc considérer ces formes complexes comme des agrégats d'individus, et rien ne prouve *a priori* que ces colonies ne soient pas formées par deux espèces microbiennes.

Il est vrai que si nous regardons à l'autre extrémité de la chaîne que nous connaissons déjà, nous trouvons encore qu'elle se ferme par la forme ronde qui serait également commune aux deux espèces.

Pour arriver à donner une solution nette de cette question, j'ai cherché dans une autre voie. J'ai transformé à la température de 35° des cultures d'origine très récente, par une série de réensemencements effectués toutes les 48 heures sur gélose acide. Ces cultures, conservées ensuite à la température de la chambre sur milieu alcalin, donnent, au bout de 15 jours,

deux sortes de colonies; les unes normales, les autres blanches, nacréées, luisantes; ensemencées séparément et portées brusquement sur gélose acide à la température de 35°, elles donnent les unes et les autres des formes ramifiées.

Inoculées séparément ou ensemble, elles produisent dans tous les cas, au bout de 12 à 15 jours, de nombreux tubercules radicaux. On ne peut plus admettre après tous ces passages que chacune des colonies séparées dans la suite soit formée par deux germes d'espèces différentes. Il faut donc considérer toutes les variétés de microbes qui ont été examinées jusqu'ici comme des modifications d'une espèce unique.

Conclusions. — La série de faits que je viens d'exposer entraîne un certain nombre de conclusions.

Ce qui frappe tout d'abord, c'est la variété des formes que l'on peut obtenir sur les milieux artificiels; mais il faut se hâter d'ajouter que, dans l'intérieur même des nodosités, ils'opère des transformations analogues.

Lorsqu'on examine le contenu de ces organes épuisés, on ne trouve plus que des formes bacillaires ou des formes rondes qui n'offrent aucune parenté apparente avec les microbes ramifiés si caractéristiques des jeunes tubercules. M. Laurent les considère comme des formes saprophytes du sol attirées dans ces régions par l'abondance de la nourriture. Elles donnent, en effet, très rarement, des tubercules par inoculation et, de plus, leurs cultures ne présentent plus les caractères des bacilles typiques. Comme les expériences précédentes montrent que le microbe des nodosités peut perdre toutes les propriétés qu'on est convenu de regarder comme caractéristiques, on peut, en groupant les faits épars dans la première partie de ce travail, donner une interprétation des transformations qui ont leur siège dans les tubercules mêmes.

J'ai déjà montré comment se fait l'infection, comment naissent et disparaissent les tubes muqueux, et sous quelles influences les formes rameuses succèdent aux coccobacilles. Si on reprend maintenant les tubercules à un âge plus avancé, on assiste à leur épuisement graduel par le retrait de la sève. Mais avec la disparition du liquide nourricier, l'acidité cesse également son action. Les microbes peuvent faire retour à la forme simple, et comme ils ne reçoivent plus d'aliments tout préparés,

ils s'adaptent aux nouvelles conditions d'existence qui leur sont faites. De ferments des matières hydrocarbonées, ils deviennent ferments des matières azotées, et, de fixateurs d'azote libre, ils deviennent consommateurs d'azote. Ils sont alors capables de vivre dans la terre à l'état de microbes saprophytes, et à partir de ce moment, ils se confondent avec la plupart des microorganismes qui la peuplent.

VIII

LES MICROBES DES NODOSITÉS DANS LE SOL

Personne à ma connaissance n'a isolé directement le bacille des nodosités du sol. M. Laurent a observé des kystes dans les vieux tubercules; il n'a pas réussi à les faire germer; d'après lui ils persistent dans la terre et germent sur le passage des racines, à la faveur des actions chimiotaxiques exercées par les poils absorbants. Pour M. Nobbe, il existe dans le sol une forme neutre, capable de s'adapter à la longue à une espèce de légumineuses, et de donner ainsi des races susceptibles d'envahir plus particulièrement une espèce ou un genre déterminés.

Le chapitre précédent renferme des faits qui seront un guide précieux dans la recherche des formes libres du sol.

Pour orienter mes investigations, j'ai ensemencé une trace de délayure de terre sur une série de douze tubes. Parmi toutes les colonies que j'ai obtenues ainsi, aucune ne présentait les caractères du bacille des légumineuses. Ce résultat était prévu; car au moment où les débris de tubercules radicaux se dissocient dans la terre, l'évolution des microbes est si avancée qu'il est, je le répète, impossible de les caractériser.

J'ai pris alors deux échantillons de terre; l'un A, à la surface; l'autre B, à 20-25 centimètres de profondeur. Après en avoir dilué quelques décigrammes dans de l'eau stérile, j'ai introduit deux ou trois c. c. de chacune des délayures dans deux récipients où végétaient, à l'abri des microbes, deux jeunes plants de vesce de Narbonne. En même temps, j'ai ensemencé deux séries de huit tubes de gélose avec les mêmes délayures.

Parmi ces tubes, j'en ai choisi deux (un dans chaque série), ceux qui renfermaient le plus de colonies microbiennes, tout en étant exempts de moisissures vulgaires, et, sans me soucier d'isoler les espèces, je les ai ensemencées toutes à la fois sur de nouveaux tubes, de façon à faire un grand nombre de passages. On devine aisément que cette opération a pour but de provoquer, par l'association des formes inégalement différenciées, une évolution rapide vers le stade caractéristique. De plus, il est bien évident que si le microbe qu'on se propose d'isoler se trouve dans les cultures, loin de succomber dans cette sélection forcée, il prendra plutôt le dessus sur les espèces antagonistes, puisqu'il se trouve dans les conditions les plus favorables à son développement.

Au début de ces manipulations, les deux cultures A et B étaient constituées par une couche glaireuse, peu abondante, mais elles ont acquis au bout de quelques semaines un développement luxuriant.

A 35°, sur gélose acide, elles ne produisent pas de formes rameuses après 48 heures d'étuve. Si on les abandonne ensuite à la température de la chambre pendant 6 jours, on découvre au microscope, avec un peu de patience, quelques bourgeons bien caractérisés. D'autre part, l'aspect des cultures est assez encourageant, et si l'on ne peut pas affirmer déjà qu'elles renferment le microbe cherché, le doute n'est plus possible lorsque les nodosités se sont montrées sur les deux plantes inoculées.

La culture A présente un aspect variable suivant son âge. Durant les deux ou trois premiers jours, la gélose est couverte d'un enduit sec qui rappelle un peu l'aspect du *subtilis*. Vers le quatrième jour, la surface devient humide, et une mucosité pâteuse et grisâtre coule au fond des tubes lorsqu'on les maintient debout.

Dans le mucus on ne distingue au microscope qu'un bacille court, mobile, tandis qu'avant l'apparition de cette substance, on ne trouve pour ainsi dire que de gros filaments bactériens complètement sporulés.

La culture B ne présente pas le même aspect; la mucosité s'y développe dès les premiers jours; elle est plus abondante que dans la culture A; elle est également plus hyaline et plus épaisse; elle ne renferme que des bacilles et des formes rondes.

Il s'agit maintenant d'isoler les espèces qui peuplent ces cultures, et d'y caractériser, si possible, le microbe des nodosités.

La culture *A* m'a fourni trois espèces : deux bactéries sporogènes et un bacille représenté sur six tubes par trois colonies ; les colonies de bactéries sont beaucoup plus nombreuses ; l'une d'elles, que j'appelle *a*, présente un aspect particulier ; elle s'étend à la surface de la gélose, en donnant des arborescences tout à fait comparables à celles que l'eau congelée forme sur les vitres. L'autre bactérie donne des colonies riches et chagrinées ; elle n'offre aucun intérêt.

Le bacille forme des colonies proéminentes, pâteuses, qui s'étalent en vieillissant ; je l'appelle *b*.

La culture *B* renferme un plus grand nombre d'espèces ; je n'en ai conservé qu'une seule, *c*, un bacille très mobile assez semblable comme aspect au microbe des nodosités.

Les microbes *a* et *b* attirent l'attention par la régularité avec laquelle ils se succèdent dans la culture ; j'ai déjà dit que la bactérie apparaît la première, envahit tout le tube, et donne des spores ; puis le bacille *b* se développe à son tour, et dans la culture de huit jours, il semble qu'il soit seul ; on ne trouve plus ni spores ni bactéries. En séparant les espèces contenues dans une culture âgée, afin d'être plus sûr d'obtenir les microbes producteurs de mucosité, je n'ai obtenu que 3 colonies de bacille *b*. Ceci m'a fait penser que la bactérie *a* doit présenter un stade bacillaire qui ne serait autre que *b*.

Pour établir les relations qui existent entre ces deux formes, j'ai isolé à nouveau la bactérie *a* du sol. Rien n'est plus facile : cette bactérie est très répandue à la surface de la terre arable ; et comme elle se reconnaît facilement à son mode de développement, on l'obtient à l'état de pureté au bout de sept ou huit jours. Voici comment : on prend un fragment de colonie, on le dépose au milieu d'un tube de gélose. En moins de 48 heures, la bactérie s'est propagée à plus de 2 centimètres du point d'origine ; on détache un fragment périphérique qu'on dépose sur un autre tube. En répétant cette opération trois ou quatre fois, on est parfaitement sûr d'avoir éliminé toutes les impuretés. En culture pure, la bactérie *a* donne de longs filaments qui rayonnent en tout sens, se croisent et se groupent en faisceaux visibles à l'œil nu, légèrement proéminents et adhérant fortement

à la gélose ; des filaments diffus et nuageux pénètrent dans le substratum et l'envahissent lentement. Au bout de 24 heures, les filaments les plus âgés renferment déjà des spores. Après 3 à 4 jours, ces spores germent en donnant naissance à des filaments analogues aux premiers, mais plus courts et plus gros, la culture revêt alors un aspect humide et se laisse détacher assez facilement de sa gélose. Cette seconde génération sporule très lentement à son tour, et les spores une fois formées se conservent indéfiniment. Ce n'est pas là le seul processus de reproduction que les formes courtes présentent. Au bout de quinze jours on voit poindre un peu partout de petites colonies laiteuses qui augmentent de volume ; elles sont fournies par un bacille court, noyé dans une mucosité abondante. Si on ensemente une parcelle de ces colonies, on n'obtient que la forme bactérienne et le processus recommence.

On peut l'activer par la chaleur, par l'emploi des milieux acides placés à 35°, et aussi par la concurrence vitale, comme cela se passait dans la culture A.

Les formes courtes, avant de se résoudre en coccobacilles, présentent dans chaque article une, deux ou trois condensations protoplasmiques, suivant la rapidité de la transformation. Ces granulations absorbent peu à peu la masse de la bactérie, et, une fois indépendantes, elles se reproduisent sur place en donnant des colonies laiteuses.

La fig. 9, Pl. II, représente cette évolution, et la fig. 6, Pl. I, reproduit les coccobacilles libres.

La forme bacillaire ne se fixe qu'à la longue, et c'est pour cela, précisément, que les colonies du bacille *b* étaient si rares alors qu'on s'attendait à n'obtenir qu'elles. Le bacille *b* est en effet le stade dissocié et mobile de la bactérie *a*. En partant d'une culture pure de cette dernière, on arrive à obtenir en huit jours des cultures identiques comme aspect à celles que l'on obtient en ensemençant directement le bacille *b*. Dans les deux cas la mucosité est abondante, d'une couleur rosée quand elle est épaisse, et virant au rouge orangé par la dessiccation ¹.

1. Donnons en passant les caractères que présente la bactérie *a* sur quelques milieux de culture. Ce qui précède se rapporte à la gélose de haricots.

Sur gélose de viande, elle est beaucoup plus stable.

Dans les bouillons, elle forme des zooglées hyalines qui restent longtemps en suspension dans le liquide. Au bout de plusieurs semaines, elles se désagrègent

Ceci étant établi, nos investigations se borneront désormais à identifier les deux bacilles *b* et *c* avec le microbe des nodosités. Tous deux produisent une mucosité abondante, légèrement lactescente avec *b*, et très hyaline avec *c* ; le plus souvent, la mucosité fabriquée par le bacille authentique est intermédiaire entre les deux. On sait en outre que celui-ci ne liquéfie pas la gélatine, qu'il possède un stade ramifié qui apparaît dans des conditions déterminées, qu'il fixe de l'azote dans les milieux de culture, et enfin qu'il produit des tubercules par inoculation aux légumineuses.

Voyons si les bacilles *b* et *c* possèdent ces propriétés.

Culture sur gélatine. — *b* liquéfie la gélatine d'une façon irrégulière ; si on l'ensemence en stries, il se développe une traînée grisâtre très proéminente ; quelquefois des excavations se forment sur son trajet ; leurs bords sont taillés à pic, la liquéfaction ne se généralise jamais.

c ne liquéfie pas la gélatine.

Formes ramifiées. — L'action de la température de 35° est sans action sur les microbes *b* et *c* ; ils s'y habituent très facilement, et se développent aussi abondamment et plus vite qu'à la température de la chambre.

Lorsqu'on fait usage, à 35°, de gélose additionnée de 1/1000 d'acide tartrique ou d'acide oxalique, le bacille *b* forme des filaments composés généralement de deux segments dont les extrémités paraissent vides et ne prennent pas la couleur. Pour observer les formes ramifiées, il faut examiner des cultures de 24 heures ; elles sont alors constituées par des colonies sèches, aplaties, très minces, comme de légères écailles ; elles renferment des bâtonnets enchevêtrés présentant souvent des renflements et des ramifications très nettes.

Au bout de 48 heures, les filaments commencent à se segmenter en boules, et à partir de ce moment la mucosité se forme ; dans les cultures de 3 à 4 jours on ne trouve plus de formes longues et ramifiées.

et tombent au fond des récipients en formant un dépôt pulvérulent, renfermant des bacilles fins et des spores.

Elle liquéfie énergiquement la gélatine, et se comporte ensuite dans le liquide comme dans les bouillons.

Elle ne coagule pas le lait ; elle se développe très bien sur pomme de terre glycinée, mais perd son aspect particulier : elle forme un épais enduit glaireux.

Le bacille *c* s'est montré complètement réfractaire à cette transformation; j'ai fait une série de trente réensemencements successifs, d'abord toutes les 24 heures, puis à huit heures d'intervalle; à aucun moment il n'a présenté de formes rameuses; j'ai arrosé des cultures âgées de huit heures avec quelques gouttes d'acide oxalique au 1/300; il n'en a pas trahi la moindre gêne dans son développement.

Les microbes présentaient cependant des modifications assez prononcées vers le quinzième passage: quelques-uns avaient la forme de point d'exclamation; leur contenu, d'une manière générale, était granuleux et vacuolaire. Le 15^e passage a servi à ensemençer un tube de gélose alcaline; la culture a été conservée à la température de la chambre. Le 30^e passage a été exposé à la température de 35° pendant 30 jours, puis ensemençé sur milieu alcalin et conservé à la température de la chambre. Nous le retrouverons plus loin.

Fixation de l'azote libre. — Pour étudier le pouvoir fixateur des bacilles *b* et *c* vis-à-vis de l'azote libre, j'ai employé la méthode habituelle. Le tableau suivant contient le résumé des résultats obtenus :

Désignation des cultures.	Sucre initial. mgr.	Sucre consommé. mgr.	Az. init. mgr.	Az. final. mgr.	Az. gagné. mgr.
N ^o 1 (b)	1500	»	19,5	22,8	3,3
2 (c)	id.	»	19,5	25,5	6,0
3 (b)	1750	585	7,1	7,4	0,4
4 (c)	id.	1376	7,1	10	2,9
5 (b+c)	id.	1307	7,1	13,4	6,3

Les cultures n^{os} 1 et 2 ont été beaucoup plus actives que les n^{os} 3 et 4. L'explication se trouve peut-être dans la composition des bouillons; ce qui montre d'ailleurs que le second n'est pas favorable, c'est l'apparition des spores dans le n^o 3. Par contre les deux formes associées doublent la quantité d'azote initial; ceci prouve que les deux microbes s'influencent favorablement, à l'instar des formes différenciées des microbes des nodosités. L'aspect des cultures concorde bien avec ces résultats, d'après ce que l'on sait des relations de la mucosité avec l'azote gagné. Dans le vase n^o 5, le bouillon est littéralement gélatinisé.

Inoculation des plantes. — Jusqu'ici, il n'y a pas concordance complète entre les caractères du bacille *c* et ceux du microbe

des nodosités; *b* seul répond à toutes les exigences; *c* possède à un haut degré la faculté de fixer l'azote libre, mais il ne produit pas de formes rameuses. L'inoculation des plantes va trancher la question.

J'ai inoculé les formes microbiennes suivantes en employant encore des vesces de Narbonne végétant en milieu stérile ;

1° Bactérie *a* ; 2° bacille *b* ; 3° bacille *c* ; 4° *a* + *b* ; 5° *a* + *c* ; 6° *c* + *b*. Les plants inoculés avec (*c* + *b*) seuls ont donné des résultats positifs, qui ont été confirmés immédiatement après par une nouvelle série d'expériences.

Si on rapproche ces résultats de ceux qu'on a obtenus avec les formes différenciées du bacille authentique, on saisit facilement l'harmonie qui existe entre eux ; et comme on a déjà établi que les variétés de microbes, étudiées dans le chapitre précédent, appartiennent à une espèce unique, on est en droit de conclure que les deux microbes *b* et *c* constituent aussi deux formes différentes des microbes des nodosités.

On connaît donc maintenant la forme de résistance de ce microbe ; c'est la bactérie *a* ; mais, à côté de cette forme de résistance, il y en a d'autres qui vivent à l'état de liberté dans le sol, comme des microbes saprophytes ; le bacille *c* est de ce nombre. Comme c'est lui qui se rapprochait le plus de la forme typique, parmi toutes les espèces qui peuplaient la culture B, c'est à lui que j'ai donné la préférence dans mes démonstrations. Il se peut que toutes les autres espèces qui poussaient à côté de *c* soient distinctes du microbe des nodosités. Néanmoins il existait dans cette culture un ensemble d'espèces qui s'influençaient d'une manière favorable. Aucune des espèces associées ne donnait en culture pure un développement comparable à celui qu'atteignait la culture B, et le bacille *c* lui-même n'a fourni ce résultat qu'à la suite d'un grand nombre de passages sur gélose.

La bactérie *a* est un microbe immobile ; elle est incapable d'obéir aux actions chimiotaxiques exercées par la racine des légumineuses ; elle ne s'implante pas sur ces organes ; ce sont les formes libres et mobiles seules qui produisent l'infection des plantes.

IX

LES MICROBES DES NODOSITÉS POSSÈDENT UNE FORME OOSPORA

J'ai montré comment la bactérie *a* passe au stade bacillaire *b*. J'ai insisté sur ce fait, que le bacille *b* ne se fixe que lentement; lorsque celui-ci affecte la forme ramifiée ou lorsque le microbe des nodosités subit les mêmes transformations, on assiste encore à un commencement d'évolution vers une forme ignorée. On ne peut pas dire que ces éléments ramifiés représentent un stade de souffrance, puisqu'ils sont la règle dans les tubercules radicaux. Quelle peut être cette forme jusqu'ici purement hypothétique? Si on regarde les figures 2 et 3, Pl. I, et les figures 1 et 2, Pl. II, on voit que les organismes qu'elles représentent offrent la plus grande analogie avec les fragments dissociés d'un mycélium âgé d'oospora; je n'ai pas réussi à conserver et à fixer ces formes dans mes cultures; mais elles se sont développées elles-mêmes spontanément dans la culture faite avec le 15^e passage du bacille *c*, conservée à la température de la chambre (voir p. 143). Au bout de deux mois, cette culture, placée horizontalement, portait à la surface de la mucosité¹ quatre petits amas d'une poussière d'un gris cendré, accompagnés d'un grand nombre d'autres particules presque invisibles de la même substance, réparties surtout autour des taches principales.

Je n'ai pas eu de peine à reconnaître la forme oospora avec son mode de sporulation en chapelets. Dans la masse de la mucosité, on trouvait un grand nombre de microbes en voie de transformation; les uns allongés seulement, les autres présentant déjà plusieurs rameaux et formant quelquefois des paquets enchevêtrés (fig. 10, Pl. I).

En présence de ce résultat, qui m'a surpris, étant donné l'échec auquel je m'étais heurté, précisément avec le bacille *c*, dans la recherche des formes ramifiées, je me suis empressé de

1. Cette substance se dessèche très lentement; lorsqu'on incline les tubes, elle s'étale uniformément sur la gélose et la protège contre la dessiccation, pendant cinq ou six mois, même dans les tubes fermés simplement au coton.

reprendre la culture de ce microbe sur milieux acides, mais cette fois à la température de 39-40°.

Dès le premier essai, j'ai obtenu en 24 heures un résultat comparable à celui que m'a fourni le bacille des légumineuses. La ramification devient générale au bout de deux ou trois passages : les microbes ramifiés forment des amas zoogléiques qui se conservent assez longtemps dans la mucosité, mais ils disparaissent toujours; ils tranchent nettement sur le reste de la préparation, parce que les éléments qui les constituent sont plus gros, se colorent mieux que les bacilles simples.

En somme, on voit que le bacille *c* possède aussi la faculté d'évoluer vers la forme oospora; mais on ne peut fixer celle-ci qu'à la condition d'épuiser complètement les générations successives qui prennent naissance dans une série de réensemencements répétés un très grand nombre de fois dans un temps très court, et dans les conditions les plus défavorables pour le stade que l'on veut transformer.

La culture issue du 30^e passage n'a pas présenté ces transformations. Elle avait été conservée, je le répète, pendant 30 jours à 35°, sur milieu acide; la culture était déjà desséchée au moment où elle a été rajeunie.

La forme oospora, que j'ai obtenue ainsi, présente à peu près les caractères de l'espèce qui a été décrite dans ces *Annales*, t. VI, par MM. Sauvageau et Radais; elle pousse très bien sur gélose de bouillon de haricots neutre ou alcaline, additionnée de 3 0/0 de sucre, elle donne des conidies à partir du 4^e jour à la température de la chambre. Elle se cultive très bien sur gélose de viande peptonisée; mais, dans ces conditions, elle ne produit pas de spores. Elle se développe d'une façon luxuriante sur pomme de terre glycinée, en donnant des spores à partir du 4^e jour; la pomme de terre verdit d'abord, puis brunit.

L'oospora partage cette préférence marquée pour la pomme de terre glycinée avec la bactérie *a* et les bacilles *b* et *c*; ceux-ci surtout produisent une couche glaireuse extrêmement épaisse et des dépôts très abondants; le microbe retiré des nodosités est plus exigeant; il pousse mal sur pomme de terre ordinaire et encore plus mal sur pomme de terre glycinée.

La pomme de terre n'est pas d'ailleurs le seul milieu qui établisse une démarcation entre le bacille extrait de la plante et

les microbes *b* et *c* qui proviennent directement de la terre; le premier ne pousse pas sur gélose de viande peptonisée ni dans le bouillon de viande; tandis que *b* et *c* s'y cultivent bien, sans toutefois produire de mucus; dans le bouillon, ils forment des voiles où le microscope montre des formes ramifiées nombreuses; secs et écailleux avec *b*, ces voiles sont plus gras avec *c*.

Nous devons maintenant identifier par un autre procédé la bactérie *a*, la forme oospora et la forme caractéristique des microbes des nodosités, en les ramenant à trois microbes identiques, au point de vue de la forme et des propriétés physiologiques.

Le genre oospora renferme plusieurs espèces parasites. Sans rien préjuger des propriétés pathogènes de celle que j'ai obtenue, il est permis de supposer qu'elle pourra s'acclimater dans l'organisme des animaux, surtout si on la met à l'abri des phagocytes par le procédé de culture en sac préconisé par MM. Roux, Metchnikoff et Salimbeni (*Annales de l'I. P.* t. XI).

Le microbe des nodosités, bien qu'essentiellement aérobie, ne meurt pas vite, lorsqu'on le prive d'air; comme il peut, d'autre part, évoluer vers un stade saprophyte, il est permis d'espérer qu'il résistera également à ce procédé de culture. La bactérie *a* supportera également cette épreuve en raison de son caractère exclusivement saprophyte.

Pour ménager autant que possible la transition entre la vie aérobie et la vie anaérobie, il suffira d'alterner la culture en bouillon avec les passages dans le péritoine, qui ne devront pas durer plus de deux ou trois jours.

Les microbes des nodosités ont été cultivés dans le péritoine du lapin, la bactérie *a* ou le bacille *b* qui en provient directement, et la forme oospora, dans celui du cobaye.

On a ensemencé le contenu de chaque sac dans du bouillon de haricots et de viande, et sur des tubes de gélose de même nature. Les cultures placées 24 heures à 35° étaient examinées au microscope avant de faire le passage suivant. Enfin, pour s'assurer que les sacs étaient demeurés intacts, on ensemait un tube de gélose avec l'exsudat contenu dans la fausse membrane qui se forme autour du sac.

Le premier passage a duré 48 heures. A l'œil nu, il était impossible de distinguer à l'aspect du bouillon le moindre développement dans les sacs.

Le bacille *b* avait évolué vers la forme ramifiée, représentée dans la fig. 7, Pl. II.

Le microbe des nodosités présentait des formes renflées, des formes irrégulières dont quelques-unes ramifiées.

L'oospora, qui avait été ensemencé à l'état de mycélium¹, est représenté par quelques fragments de tubes vides à côté desquels on observe quelques formes rondes groupées par deux.

Les milieux liquides ensemencés avec ces trois formes se troublent au bout de 24 heures. En goutte suspendue, on ne trouve qu'une forme à peu près ronde, isolée, ou groupée par deux, ou réunie en chaînes.

Les milieux solides présentent les mêmes microbes qui poussent assez abondamment. Au bout de trois semaines, la forme oospora apparaît, représentée par 3 colonies; le microbe des nodosités donne immédiatement quelques colonies de bactéries *a*, reconnaissables à leur mode de développement si caractéristique; les filaments produisent des spores au bout de trois jours; il y a donc eu un retour brusque vers le stade sporulé; cette transformation ne s'est jamais produite dans mes cultures ordinaires. Par contre, aucune colonie ne rappelle par son aspect celles du bacille typique.

Toutes ces formes de transition disparaissent au bout du troisième passage en sac, et, à partir de ce moment, les trois cultures sont identiques sur les mêmes milieux de culture, bien que les microbes aient passé par deux espèces animales et à des époques différentes.

La forme commune aux trois microbes est une forme ronde d'une finesse extrême; les grains ont un diamètre de 0,45 à 0,47 μ , ils sont isolés ou groupés par deux ou même réunis en petites chaînes.

Tous trois forment un enduit très mince sur les milieux solides, bleuâtre par transparence et gris par réflexion.

Ils troublent uniformément le bouillon, puis se déposent au bout de trois ou quatre jours en formant un amas visqueux qui s'élève en fils par l'agitation.

1. Les spores ne germent pas dans les sacs mêmes après un mois de séjour dans le péritoine. Si on les reprend dans le sac pour les ensemencer sur des tubes de gélose de viande, elles germent et donnent exclusivement des colonies d'oospora qui produisent des spores au bout de huit à dix jours; on a vu qu'avant ce passage elles ne sporulaient pas sur ce milieu.

Ils liquéfient la gélatine sans la troubler.

Ils coagulent énergiquement le lait ; le coagulum se rétracte et se sépare du sérum.

Ils acidifient tous les bouillons sans dégagement de gaz, même dans les bouillons lactosés. Si on les additionne d'un peu de carbonate de chaux, les bulles se forment au bout de trois ou quatre heures.

La réaction acide des bouillons permet de pousser plus loin l'identification en déterminant la nature et la quantité des acides qui prennent naissance dans des milieux de composition variable.

Voici les résultats obtenus avec trois bouillons différents :

NATURE DES MICROBES	BOUILLON DE VIANDE à 1,5/100 de peptone.			BOUILLON DE HARICOT à 3/100 de lactose.				BOUILLON DE HARICOT à 3/100 de sucre.			
	Acidité totale p. 0 U.	Acide lactique.	Acide acétique.	Acidité totale.	Acide lactique.	Acide acétique.	Acide formique.	Acidité totale.	Acide lactique.	Acide acétique.	Acide formique.
Bacille des nod.	»	»	»	1,15	0,73	traces.	0,12	0,27	0,10	0,13	0,05
Bacille b.	2,5	2,05	0,45	1,20	0,64	id.	0,56	0,30	0,04	0,2	0,06
Oospora.	2,05	0,97	1,12	1,22	0,59	id.	0,63	0,34	traces.	0,27	traces.

Comme on le voit, les trois microbes, placés dans les mêmes conditions, produisent les mêmes acides à peu près dans les mêmes proportions.

Propriétés pathogènes des trois formes microbiennes. — Ici encore les résultats concordent. Les petits lapins de 1,000 grammes, inoculés sous la peau ou dans le péritoine, meurent au bout d'un temps variant de 10 jours à 3 semaines. L'inoculation sous-cutanée est toujours suivie d'un abcès qui évolue lentement.

Le sang ne renferme jamais de microbes ; on en trouve toujours dans l'exsudat péritonéal qui est assez abondant. Les cultures fournies par cet exsudat possèdent les mêmes caractères que les cultures qui ont servi aux inoculations.

Un lapin de 1,000 grammes, inoculé sous la peau avec 1 c. c. d'une culture en bouillon faite avec le contenu du premier sac

ensemencé avec le microbe des nodosités, est mort au bout de 3 semaines. L'exsudat péritonéal, aspiré à l'aide d'une pipette à travers la paroi abdominale, ensemencé sur un tube de gélose, a donné une culture qui renfermait quelques colonies d'oospora à côté de colonies nombreuses dues à la forme ronde. Le contenu du même sac a déjà donné la bactérie α : on a donc retrouvé, en partant du bacille authentique des légumineuses, les deux formes que l'on a déjà obtenues avec les microbes retirés du sol. Mais les stades sporogènes sont très instables dans les conditions où nous avons opéré. Il faut les saisir au bon moment.

Ainsi, en résumé, les microbes des nodosités présentent une succession de générations alternantes qui rappellent assez exactement le mode de développement d'un grand nombre de végétaux et d'animaux inférieurs.

La bactérie α est répandue dans le sol, surtout à la surface ; on la rencontre de préférence en hiver et au printemps ; pour la forme oospora c'est l'inverse ; celle-ci est très rare en hiver et très commune à la fin de l'été. C'est ainsi par exemple qu'au mois de septembre, sur un total de 469 colonies des différentes espèces microbiennes qui ont poussé sur six tubes de gélose de haricots ensemencés avec une trace de délayure de terre, j'ai compté une colonie de bactéries α , et 43 colonies appartenant à deux ou trois espèces d'oospora. Ce résultat, vérifié immédiatement après, avec des tubes de gélose de viande, s'est confirmé rigoureusement. Sans accorder à ces chiffres plus d'importance qu'ils n'en comportent, il est permis de dire toutefois que la succession des saisons exerce une certaine influence sur les formes sporogènes du microbe des nodosités. Les spores endogènes, plus résistantes aux intempéries, sont surtout communes en hiver, tandis que les conidies, qui constituent d'excellents agents de dissémination, se rencontrent principalement en été. C'est là, on le sait, une loi très générale chez les champignons microscopiques.

La réaction de Gram appliquée aux microbes des nodosités. — La méthode de coloration de Gram est employée couramment pour caractériser les espèces microbiennes ; elle ne s'applique pas aux différentes formes des microbes des nodosités. Ainsi, les microbes contenus dans les tubercules, colorés par le violet d'Ehrlich, et traités ensuite par la solution de Gram, ne se déco-

lorent pas complètement par l'alcool. Au bout de deux passages sur gélose, ils se décolorent complètement.

Le bacille *b* prend le Gram plus ou moins bien; le bacille *c* ne le prend pas; toutes les formes rondes le prennent, ainsi que quelques formes bacillaires cultivées sur pomme de terre, au moment où elles évoluent vers la forme ronde; les autres bacilles différenciés ne le prennent pas. Les deux formes sporogènes le prennent.

Les formes ramifiées obtenues avec le bacille *c* le prennent également; cependant la décoloration est partielle; sur un même filament, les parties renflées restent colorées pendant que tout le reste se décolore.

Des deux formes bacillaires issues de la forme ronde, culture n° 3, tableau p. 133, l'une se décolore complètement, l'autre partiellement.

X

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Pour résumer les conclusions de ce travail, il nous suffira d'exposer brièvement l'histoire du bacille des légumineuses, telle que nous venons de l'établir.

Les formes libres du sol, attirées sur les racines des légumineuses par l'intermédiaire des hydrates de carbone diffusés dans la région des poils absorbants, pénètrent dans les tissus à l'état de coccobacilles, et provoquent la formation d'un méristème qui donne naissance aux tubercules.

Tant que les vaisseaux ne sont pas formés, ces coccobacilles restent englobés dans une matière glaireuse qui simule l'aspect d'un mycélium. Plus tard, lorsque la sève circule dans les tubercules, la mucosité est emportée dans toutes les régions de la plante; les bacilles sont alors exposés à l'action permanente des acides dissous dans le suc végétal; ils réagissent contre cette influence en formant des ramifications. Le pseudo-mycélium ne constitue pas un organisme vivant, une forme de transition du microbe des nodosités; les observations que nous avons faites dans le cours de ce travail (p. 6 et 135) confirment la conclusion que nous avons exposée (p. 13), on ne peut pas

retrouver ces tubes muqueux, ni dans la pulpe des nodosités broyées sur une lame, ni dans les coupes colorées par les couleurs d'aniline ; il n'en serait pas de même si la forme d'infection était la bactérie *a* ou la forme oospora, ces deux microorganismes résistant à tous les réactifs colorants aussi bien d'ailleurs qu'aux manipulations nécessitées par la préparation des inclusions pour les coupes en série.

Lorsque la plante arrive au terme de son évolution, les nodosités privées de sève et d'aliments se vident en partie ; elles ne renferment plus que des formes simples qui ne sont pas des formes banales du sol, mais des microbes issus du bacille typique, possédant des propriétés nouvelles et capables de vivre en liberté dans le sol.

La fixation de l'azote libre se fait dans les cultures artificielles aussi bien que dans les nodosités ; elle est là comme ici le résultat d'une synthèse qui se fait aux dépens de l'énergie mise en jeu par la combustion des hydrates de carbone.

Toutes les formes si variées qui se rencontrent dans la nature peuvent s'obtenir dans les milieux artificiels en faisant agir convenablement l'action des acides et de la chaleur ; les milieux peptonisés produisent les mêmes résultats ; on les obtient encore en exagérant la richesse en sucre ou en composés minéraux alimentaires.

Les bacilles récemment isolés des nodosités conservent la propriété de produire de nouveaux tubercules par inoculation ; les formes différenciées dans le sens de la vie saprophyte la perdent peu à peu ; mais le travail qu'une seule de ces formes est incapable de produire, deux formes associées peuvent l'accomplir ; cette influence de l'association est tout à fait nette, aussi bien dans la production des nodosités sur les racines que dans la fixation de l'azote libre dans les cultures.

C'est évidemment grâce à cette propriété que les formes saprophytes du sol parviennent à se fixer sur les racines et à former des tubercules ; nous n'avons pas réussi à isoler de la terre un microbe capable par lui-même de produire des nodosités. On ne peut pas en inférer qu'il n'en existe pas à aucune époque de l'année ; ceux que nous avons obtenus ont été isolés au commencement du printemps.

Les formes indépendantes des microbes des nodosités

représentent un stade dissocié d'un végétal qui possède en outre deux formes sporogènes ; l'une, la bactérie *a*, donne des spores endogènes, l'autre est un oospora et donne des conidies. Ces deux derniers stades se rencontrent de préférence à la surface du sol ; la bactérie *a* est très répandue en hiver, la forme oospora se rencontre surtout à la fin de l'été. Ce mode de développement pourrait bien être plus répandu dans le monde des microbes qu'on ne se l'imagine ; l'évolution de ces êtres serait ainsi semblable à celle d'un grand nombre de végétaux et d'animaux inférieurs.

Le microbe des légumineuses est pathogène pour quelques espèces animales ; il affecte dans l'organisme une forme à peu près ronde d'un diamètre très réduit ; elle a une tendance à se mettre en chaîne.

EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE I

Fig. 1. — Microbes extraits de la pulpe des nodosités et transformés par un séjour de 24 heures sur gélose au bouillon de haricots à 3 0/0 de sucre. Une forme ramifiée donne naissance à plusieurs coccobacilles séparés par des vésicules qui se résorbent rapidement. Les vésicules se produisent sous l'influence des courants osmotiques provoqués par le changement d'habitat des microbes. G = 1,200 D.

Fig. 2. — Formes en poires obtenues sur gélose de viande peptonisée, les portions incolores représentent des vacuoles. G = 1,200 D.

Fig. 3. — Formes ramifiées et renflées obtenues à 35° sur gélose acide; elles ressemblent aux formes dissociées des filaments âgés d'oospora. G = 1,200 D.

Fig. 4. — Tubes muqueux formés dans une culture de bouillon de haricots à 6 0/0 de saccharose, traversant une portion de membrane. G = 1200 D.

Fig. 5. — Les mêmes à un grossissement plus faible, 500 D environ.

Fig. 6. — Tubes muqueux formés dans le feutrage des poils absorbants, obtenus avec un bacille qui ne donne plus de mucosité. — L'intérieur de ce tube est rempli de coccobacilles comme le tube de la fig. 4.

Les filaments foncés sont des fragments de poils absorbants. G = 100 D.

Fig. 7. — Aspect d'une culture sur plaque de gélose de la bactérie, vue à l'œil nu.

Fig. 8. — La même à un grossissement de 100 D. Toutes les bactéries sont transformées en spores.

Fig. 9. — Forme courte de bactérie *c* se transformant en coccobacilles. Ceux-ci restent disposés en files dans l'intérieur du filament qui se colore de plus en plus mal. Les coccobacilles se reproduisent et forment des zoogléee enfermées dans une capsule commune.

Fig. 10. — Culture du bacille *a* évoluant vers la forme oospora; les filaments n'ont pas encore donné de conidies.

PLANCHE II

Fig. 1. — Forme ramifiée du bacille des nodosités obtenues sur gélose alcaline à 35°. G = 1,200 D.

Fig. 2. — Portion obtenue avec la même préparation, montrant les

formes ramifiées groupées par l'évaporation du liquide sur la lame de verre $G = 1,200$ D.

Fig. 3 — Formes ramifiées de la même culture se résolvant en bacilles, après un séjour de quelques heures en milieu liquide à 25° . $G = 1,200$ D.

Fig. 4 — Bactérie *a*. Culture âgée, sur pomme de terre glycinée. $G = 1,000$ D.

Fig. 5. — Spores de la bactérie *a* obtenues sur gélose au bouillon de haricot. $G = 1,000$ D.

Fig. 6. — Bactérie *a* se transformant en coccobacilles. Culture diluée dans de l'eau distillée. $G = 1,200$ D.

Fig. 7. — Forme ramifiée obtenue à 35° sur gélose acide avec le coccobacille issu de la bactérie. $G = 1,200$ D.

Fig. 8. — Fragment de colonie jeune d'oospora. $G = 1,000$ D.

Fig. 9. — Forme commune à la bactérie *a*, au microbe des nodosités, et à la forme oospora, obtenue par des passages en sac de collodion dans le péritoine des animaux. $G = 1,200$ D.

REVUES ET ANALYSES

QUE SAVONS-NOUS DE L'ORIGINE DES SACCHAROMYCES ?

PAR M. ALB. KLOCKER ET H. SCHIONNING

(Travaux du laboratoire de Carlsberg, t. IV, 1896.)

Voici une analyse qui attend depuis longtemps *sur le marbre*, comme on dit dans les imprimeries. Elle a trait à une question sur laquelle les *Annales* sont souvent revenues, celle de l'origine des levures. Doit-on considérer ces levures comme formant une espèce indépendante, ou ont-elles une relation génétique avec quelque autre végétal microscopique auquel on pourrait les rattacher ?

Nous avons, il y a deux ans, publié le résumé d'un travail de M. Juhler qui, répondant à cette question, faisait dériver la levure d'un *aspergillus* qui sert de temps immémorial, au Japon, pour faire fermenter le riz, et auquel on a donné, à raison de ce fait, le nom d'*aspergillus oryzae*. Semé dans certaines conditions, ce végétal donnerait des formes bourgeonnantes capables de produire une fermentation alcoolique.

Cette conclusion de Juhler, appuyée par Jorgensen et par Sorel, fut bientôt contestée par Wehmer, et par les auteurs du mémoire que nous analysons. Une polémique s'ensuivit, polémique dont le mémoire résume, non sans entrain, les diverses péripéties. Peut-être même met-il un peu trop d'insistance à reprocher aux savants qui se sont occupés de ce sujet leurs erreurs et leurs contradictions. Qui n'a pas commis d'erreurs ? Et qu'importe du moment qu'elles sont redressées ? La science est une quêteuse à domicile : chaque jour elle fait le départ des pièces fausses qu'elle a reçues et ne garde nulle rancune à ceux de qui elle les tient, à la condition que ce ne soit pas chez eux une habitude. Quant aux contradictions, lorsqu'elles sont, chez un savant, le remplacement d'un mauvais sou par un bon, au lieu de l'en gronder, elle doit lui en savoir gré.

Les détails de la polémique résumée par MM. Klöcker et Schiönning n'ont du reste plus qu'un intérêt historique et rétrospectif, et il suffira,

pour ceux que la question intéresserait, d'emprunter au mémoire que j'analyse la bibliographie du sujet. Mais il est curieux d'envisager cette discussion au point de vue philosophique : on y voit combien les questions de fait s'embrouillent lorsqu'on les mélange de questions de mot.

Ici la question de fait était simple, relativement. Historiquement et scientifiquement, elle se posait de la façon suivante : Connaît-on un végétal microscopique capable de donner, dans certaines conditions d'existence, et à la suite de changements survenant dans la forme et dans les fonctions de quelques-uns de ses éléments, des cellules indéfiniment bourgeonnantes, à la façon de la levure, et capables comme elle de produire des fermentations alcooliques.

Cette question, remarquons-le, est une question de fait, indépendante de toute classification. On la complique dès qu'on y introduit la botanique. Hansen, par exemple, a été conduit par ses études soigneuses à attribuer une grande importance à la formation des spores dans les levures, et à séparer celles qui en donnent et qu'il appelle des *saccharomyces*, de celles qui n'en donnent jamais, et qu'il appelle des *non-saccharomyces*. C'est son droit, et cette division, intéressante au point de vue botanique, eût peut-être été utile si elle avait été acceptée par tous. Comme elle ne s'imposait pas, comme elle disloquait ce monde des levures, si intéressant au point de vue scientifique et industriel, en laissant parmi les *saccharomyces* authentiques les mycodermes du vin, incapables de produire une fermentation régulière, et en rangeant parmi les *non-saccharomyces* la levure apiculée qui est une levure véritable, beaucoup de savants se sont cru le droit de dédaigner la spore comme moyen de classification, de continuer à appeler *saccharomyces* toutes les levures capables de produire une fermentation, de sorte que les savants se sont mis à parler deux langues différentes, et que la question de fait s'est compliquée d'une question de mots qui ne pouvait que l'obscurcir.

Toutes les discussions, même les plus confuses, finissent pourtant par s'éclaircir dès qu'on les aborde par l'expérience, c'est-à-dire dès qu'on revient aux faits. Naturellement on a cherché tout d'abord à faire dériver les levures des moisissures pourvues d'un mycélium, comme *Aspergillus orizæ*. Ce qu'on cherchait était d'établir des transitions, de faire dériver des levures de la transformation des filaments mycéliens, puis de faire dériver des mycéliums d'abord, des moisissures complètes ensuite, desensemencements de levure.

C'est un des adversaires de la thèse de Juhler qui a le premier réussi à produire aux dépens d'une levure un mycélium typique. Hansen, en étudiant le *saccharomyces Ludwigi*, trouvé par Ludwig dans une exsudation muqueuse d'un chêne, a trouvé que cette levure

et un certain nombre d'autres peuvent donner des filaments cylindriques et rameux qui en font de vrais mycéliums. Mais jamais la transformation n'est allée plus loin, et, réduit à ces termes, l'argument était insuffisant pour démontrer une relation génétique entre la levure et un champignon supérieur.

Les preuves fournies par Juhler, Jörgensen, étaient de sens inverse. En ensemençant dans certaines conditions de l'*aspergillus orizæ* en semences pures, on voyait des filaments mycéliens devenir des levures, et Sorel avait ajouté que l'ensemencement de levures pures sur du riz cuit à la vapeur donnait de nouveau de l'*aspergillus*. MM. Klöcker et Schionning ont répété sous toutes leurs formes les essais précédents, avec la seule précaution de prendre des semences pures, et n'ont pu retrouver les mêmes faits. Il y a dans l'*aspergillus orizæ*, tel qu'il est fourni par l'industrie, une levure et un *aspergillus*; quand on les ensemece sur certains milieux, c'est l'*aspergillus* qui se développe seul. Sur d'autres, c'est la levure. Mais il n'y a aucune relation génétique entre l'un et l'autre.

Cette thèse est acceptée de tous les savants qui ont depuis étudié ce sujet. M. Kayser, qui l'a étudiée dans mon laboratoire de l'Institut agronomique, l'accepte aussi pleinement, et MM. Jörgensen et Juhler n'y contredisent plus.

MM. Klöcker et Schionning sont allés plus loin. Ils ont voulu voir si des levures ne pouvaient pas provenir de formes telles que le *dematium*, le *cladosporium herbarum*, dont la parenté avec les levures est soupçonnée depuis longtemps. Ici la réponse est moins topique. En opérant purement, on n'a jamais vu naître de *saccharomyces* formant des endospores, quelle que fût la variété des conditions offertes au *dematium* : cultures pures en milieux divers, ou sur les fruits mûrs et non mûrs, en nature libre ou dans des serres. Des fruits qu'on met à l'abri des insectes ou des poussières extérieures, en les enfermant dans des vases, des flacons, des cages de verre, au moment où ils ne sont pas encore mûrs, portent, à leur maturité, des *dematium* et des *cladosporium* en abondance, mais ne donnent pas de *saccharomyces* authentiques, de quelque façon qu'on les traite. Il y avait, au contraire, fréquemment des *saccharomyces* sur les fruits non enfermés.

Rappelons-nous ici que la question de savoir s'il y a des *saccharomyces* vrais n'est intéressante qu'au point de vue de la classification. Mais la vraie question, importante au point de vue génétique, c'est s'il naît aux dépens des cellules de *dematium* ou de *cladosporium*, de formes bourgeonnantes, sporifères ou non, capables de devenir des ferments alcooliques. Si, comme tout le doit faire croire, MM. Klöcker et Schionning suivent la classification de Hansen et appellent *sac-*

charomyces les seules levures à endospores, ils ont répondu à la première question, mais non à la seconde.

Enfin, ils ont essayé, toujours sans succès, de provoquer des transformations de saccharomyces en champignons supérieurs, en les mettant, autant que possible, dans des conditions identiques à celles qui leur sont faites dans la nature. Tout ce travail, poursuivi avec un soin et une constance digne d'éloges, aboutit donc à une conclusion négative, mais qui n'en est pas moins importante, c'est que les *saccharomyces* doivent jusqu'à nouvel ordre être considérés comme des organismes indépendants.

DUCLAUX.

BIBLIOGRAPHIE

A. DE BARY, *Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten*. Leipzig, 1866.

MAX REESS, *Botanische Untersuchungen über die Alkoholgährungspilze*. Leipzig, 1870.

A. BÉCHAMP, Recherches sur la nature et l'origine des fermente. (*Ann. de chimie et de physique*, 4^e série, XXIII, 1871, p. 442.)

A. TRÉCUL, Recherches sur l'origine des levures lactique et alcoolique. (*Compt. rend.*, LXXIII, 1871, p. 1455.)

FRÉMY, *Compt. rend.*, LXXIII, p. 1425.

A. TRÉCUL, Remarques sur des levures lactique et alcoolique. (*Compt. rend.*, LXXV, 1872, p. 1160.)

J. DUVAL, Nouveaux faits concernant la mutabilité des germes microscopiques, (*Journ. de l'anatomie et de physiologie de Ch. Robin*, 1874, p. 489.)

CH. ROBIN, Sur la nature des fermentations en tant que phénomènes nutritifs. (*Journ. de l'anat. et de physiol.*, 1875, p. 379.)

CHAMBERLAND, Recherches sur l'origine et le développement des organismes microscopiques. *Thèse*. Paris, 1879.

PASTEUR, *Examen critique d'un écrit posthume de Cl. Bernard sur la fermentation*. Paris, 1879.

EMIL CHR. HANSEN, Bemerkungen über Hefenpilze. (*Ztschr. f. Bierbrauerei u. Malzfabrikation*, XI Jahrg. 1883, p. 871.)

DE BARY, *Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozoen und Bacterien*. Leipzig 1884.

F. LUDWIG, Ueber Alkoholgährung und Schleimfluss lebender Bäume und deren Urheber. (*Ber. d. Deutsch. botan. Gesellsch.* Bd. IV, 1886, Heft 11.)

EMIL CHR. HANSEN, Ueber die in dem Schleimflusse lebender Bäume beobachteten Mikroorganismen. (*Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk.* V Bd. 1889, nos 19, 20 et 21, p. 632 et suiv.)

EMIL CHR. HANSEN, Sur la germination des spores chez les *Saccharomyces*.

(*Compte rendu des travaux du Laboratoire de Carlsberg*, 3^e vol., 1^{re} livr., 1891, p. 44.)

O. BREFELD, *Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie*, IX Heft. Münster, 1891.

EMIL CHR. HANSEN, Kritische Untersuchungen über einige von Ludwig und Brefeld beschriebenen Oidium und Hefenformen. (*Botan. Zeit.*, 50. Jahrg. 1892, n^o 19, p. 312.)

H. MOELLER, Ueber den Zellkern und die Sporen der Hefe. (*Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk.* XII Bd., 1892, p. 537.)

EMIL CHR. HANSEN, Ueber die neuen Versuche, das Genus *Saccharomyces* zu streichen. (*Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk.* XIII Bd., 1893, n^o 4, p. 16.)

M. F. JANSSENS, *Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk.* XIII Bd., 1893, n^o 20, p. 639.

H. MOELLER, Neue Untersuchungen über den Zellkern und die Sporen der Hefe. (*Ber. d. Deutsch. Botan. Gesellschaft*, XI Bd., 1893, 7 Heft., p. 402.)

WEHMER, *Aspergillus oryzae*, der Pilz der japanischen Saké-Brauerei. (*Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk.*, 2^{te} Abth. 1895, nos 4/5 et 6.)

ALFR. JÖRGENSEN, Der Ursprung der Weinhefen. (*Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk.*, 2^{te} Abth. 1895, nos 9/10, p. 321.)

JOHN J. JUHLER, Ueber die Umbildung des *Aspergillus oryzae* in einen *Saccharomyceten*, p. 326.

WEHMER, Sakebrauerei und Pilzverzuckerung. (*Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk.*, 2^{te} Abth. 1895, nos 15/16, p. 565.)

ALFR. JÖRGENSEN, Ueber den Ursprung der Alkoholhefen. (*Ber. d. gährungsphys. Laborat. von Alfr. Jörgensen zu Kopenhagen*, I. Kopenhagen. 1895.)

KOSAI U. YABE, Ueber die bei der Sakébereitung beteiligten Pilze. (*Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk.*, 2^{te} Abth. 1895, n^o 17, p. 619.)

SOREL, Étude sur l'*Aspergillus oryzae*. (*Comptes rendus*, t. CXXI, n^o 25, 16 déc. 1895, p. 948.)

O. SEITER, Studien über die Abstammung der *Saccharomyceten*. (*Bayer. Brauer-Journal*, VI Jahrg. 1896, n^o 13, p. 145.)

A. KLÖCKER U. H. SCHÖNNING, Experimentelle Untersuchungen über die vermeintliche Umbildung verschiedener Schimmelpilze in *Saccharomyceten*. (*Centralbl. f. Bakt., Parasitenk. u. Infektionskr.*, 2^{te} Abth. 1896, nos 6 7, p. 185.)



1



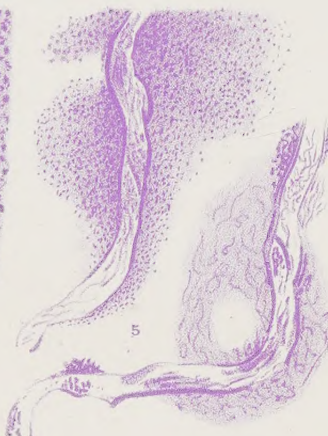
2



3



4



5



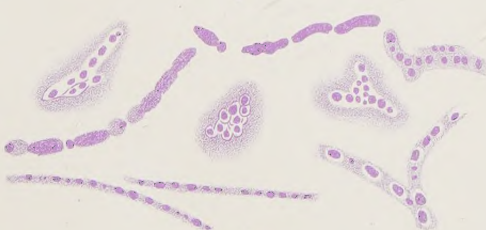
6



7



8



9



10





